República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609439-2 A2**

* B R P I 0 6 0 9 4 3 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 23/03/2006
(43) Data da Publicação: 06/04/2010
(RPI 2048)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/68 (2010.01)

(54) Título: **DETECÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A AGENTES MODULADORES DE GDF-8**

(30) Prioridade Unionista: 23/03/2005 US 60/664,643

(73) Titular(es): WYETH

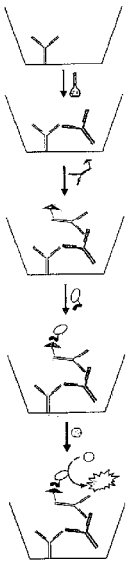
(72) Inventor(es): ALISON JOYCE, DENISE M. O HARA, JOHN A. NOWAK, JOHN G. CRYAN , JOSEPH W. RAJEWSKI III, NEIL M. WOLFMAN, SHUJUN SUN, TERESA M CAIAZZO

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006010711 de 23/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/107611de 12/10/2006

(57) Resumo: DETECÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGIÇA A AGENTES MODULADORES DE GDF-8. A presente invenção refere-se a processos para a detecção de anticorpos para um agente modulador de GDF-8 tal como, por exemplo, MYO-029, em uma amostra biológica. São também incluídos os processos para a detecção de uma resposta imunológica para um agente modulador de GDF-8. Em particular, são fornecidos aqui processos para avaliar uma resposta imunológica em animais, incluindo seres humanos, a um agente modulador de GDF-8 tal como um inibidor de GDF-8.



PI0609439-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DETECÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A AGENTES MODULADORES DE GDF-8"**.

Casos Relacionados

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente U. S. Provisório Nº 60/664.643, depositado em 23 de março de 2005, cujo conteúdo é incorporado aqui em sua totalidade como referência.

Antecedente

O fator de crescimento e de diferenciação-8 (GDF-8), também conhecido como miostatina, é uma proteína secretada e um membro da superfamília do fator beta de crescimento transformante (TGF-β) de fatores de crescimento relacionados estruturalmente. Os membros desta superfamília possuem propriedades reguladoras do crescimento e morfogenéticas fisiologicamente importantes (Kingsley e outros, Genes Dev. 8: 133-146 (1994); Hoodless e outros, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 228: 235-272 (1998)). Similarmente, compartilham uma organização estrutural comum que inclui sinal peptídeo curto para a secreção e uma parte amino terminal separada de uma parte carbóxi terminal bioativa por um sítio de clivagem proteolítico altamente conservado.

O GDF-8 humano é sintetizado na forma de uma proteína precursora longa de 375 aminoácidos que inclui uma porção pró-peptídica amino terminal e uma porção madura carbóxi terminal. O pró-peptídeo é clivado do GDF-8 maduro em Arg-266. A proteína GDF-8 madura é ativa na forma de um homodímero ligado por dissulfeto. Após o processamento proteolítico, acredita-se que dois pró-peptídeos de GDF-8 permaneçam complexados de forma não covalente com o dímero do domínio maduro de GDF-8, mantendo GDF-8 em um estado inativo latente (Lee e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 9306- 9311 (2001); Thies e outros, Growth Factors 18: 251-259 (2001)). É sabido que outras proteínas se ligam ao GDF-8 maduro e inibem sua atividade biológica. Tais proteínas inibidoras incluem a folistatina e proteínas relacionadas com a folistatina, incluindo GASP-1 (Gamer e outros, Dev. Biol. 208: 222-232 (1999); Pub. de Patente U.S. Nº 2003-0180306-A1;

Pub. de Patente U.S. Nº 2003-0162714-A1).

Um alinhamento de seqüências de aminoácidos deduzidas de várias espécies demonstra que o GDF-8 foi altamente conservado ao longo da evolução (McPherron e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-12461 (1997)). Na verdade, as seqüências de GDF-8 de seres humanos, camundongos, ratos, suínos e de galinha são 100% idênticas na região C-terminal. No GDF-8 de babuíno, bovino e ovino, as seqüências diferem por apenas três aminoácidos. O GDF-8 de peixe paulistinha é mais divergente, mas é ainda 88% idêntico ao humano.

O GDF-8 é um regulador negativo da massa muscular esquelética que é altamente expresso no músculo esquelético em desenvolvimento e adulto. A mutação nula para GDF-8 em camundongos transgênicos é caracterizada por uma hipertrofia e uma hiperplasia notável do músculo esquelético (McPherron e outros, Nature 387: 83-90 (1997)). Aumentos similares na massa muscular esquelética são evidentes em mutações que ocorrem naturalmente do GDF-8 no gado (Ashmore e outros, Growth 38: 501-507 (1974); Swatland e outros, J. Anim. Sci. 38: 752-757 (1994); McPherron e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-12461 (1997); Kambadur e outros, Genome Res. 7: 910-915 (1997)). Estudos também mostraram que a atrofia muscular associada com infecção por HIV em seres humanos é acompanhada por aumentos na expressão da proteína GDF-8 (Gonzalez-Cadavid e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 14938-43 (1998)). Em adição, o GDF-8 pode modular a produção de enzimas específicas ao músculo (por exemplo, creatine quinase) e modular a proliferação de células mioblásticas (WO 00/43781).

Os agentes terapêuticos que inibem a atividade do GDF-8 podem ser utilizados para tratar distúrbios humanos ou de animais em que um aumento no tecido muscular seria terapeuticamente benéfico. Ainda, pode ser desejável aumentar a massa muscular ou a resistência muscular ou aumentar o crescimento ou a massa de tecido muscular, por exemplo, em animais de gado. Assim, há um interesse considerável na administração de fatores que regulam a atividade biológica de GDF-8 na forma de um agente

farmacêutico, por exemplo, para aumentar a massa muscular ou para tratar distúrbios relacionados com o tecido adiposo, com os músculos, com o metabolismo e com os ossos.

Um efeito colateral deletério encontrado em indivíduos que estão sob terapia com, por exemplo, um produto biológico é uma resposta imunológica ao agente terapêutico. A administração de um agente modulador de GDF-8 a um indivíduo pode fazer com que o indivíduo desenvolva anticorpos que se ligam especificamente ao agente modulador de GDF-8. Tal resposta imunológica pode ter várias conseqüências graves para a saúde. A formação de complexos imunológicos como um resultado da administração *in vivo* de um agente modulador de GDF-8 pode afetar a distribuição biológica e a taxa de eliminação do agente. Tais complexos podem compreender o agente modulador de GDF-8 administrado ou uma parte do mesmo, ligado às imunoglobulinas circulantes. Em geral, a formação de complexos imunológicos reduz a quantidade de agente terapêutico disponível para as finalidades terapêuticas e pode resultar na retenção do agente administrado em tecidos que não são o alvo. Em alguns casos, os complexos imunológicos circulantes podem se acumular (e potencialmente danificar) em tecidos que não são o alvo tais como o fígado e os rins.

Há um número de agentes moduladores de GDF-8 capazes de ativar uma resposta imunológica em um indivíduo, incluindo inibidores da atividade de GDF-8. MYO-029 é um anticorpo humano completo que é descrito em maiores detalhes na Pub. Patente U.S. Nº 2004-0142382. MYO-029 é capaz de se ligar ao GDF-8 maduro com alta afinidade, inibindo a atividade de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* e inibindo a atividade de GDF-8 associada com a regulação negativa da massa muscular esquelética e da densidade óssea. MYO-029 promove maior massa muscular quando administrado a camundongos.

São desejáveis métodos para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8, tal como um produto biológico. Em particular, são necessários métodos que permitem a detecção e/ou a quantificação de uma resposta imunológica aos agentes mo-

duladores de GDF-8, incluindo os inibidores de GDF-8 e anticorpos anti-GDF-8. Tais métodos permitem, por exemplo, a detecção de anticorpos para um agente modulador de GDF-8, a detecção da presença de uma resposta imunológica ao agente, o monitoramento ou a otimização do curso da terapia e a avaliação de candidatos para tratamento.

Sumário

Esta invenção se refere a métodos para detectar anticorpos que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica. Estão incluídos os métodos para a detecção de uma resposta imunológica para um agente modulador de GDF-8. Em particular, são fornecidos aqui métodos para avaliar uma resposta imunológica em animais, incluindo seres humanos, a um agente modulador de GDF-8 tal como um inibidor de GDF-8. Em uma modalidade, são fornecidos métodos para a detecção da presença de um anticorpo para um agente modulador de GDF-8 tal como MYO-029. Em particular, são fornecidos métodos para a avaliação da presença e/ou da quantidade de anticorpos, incluindo anticorpos neutralizadores, que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica de um indivíduo ao qual um agente modulador de GDF-8 foi administrado.

Em uma modalidade, é fornecido um método para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica, em que o método compreende as etapas de: (a) adição do agente modulador de GDF-8 a um ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 em um recipiente de reação; (b) adição da amostra biológica ao ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 no recipiente de reação; (c) detecção da modulação da atividade de GDF-8 pela amostra biológica; e (d) comparação da modulação da atividade de GDF-8 na presença da amostra biológica com a modulação da atividade de GDF-8 na presença do agente modulador de GDF-8 isoladamente. Em certas modalidades, o ensaio *in vitro* é um ensaio com gene repórter. Em outras modalidades, o ensaio *in vitro* é um ensaio para detectar a ligação específica ao agente modulador de GDF-8, tal como um ensaio imunológico, por exemplo.

Em certas modalidades, são fornecidos métodos para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica, que compreendem as etapas a seguir: (a) fornecimento de uma célula hospedeira que compreende uma construção com gene repórter em um recipiente de reação, em que a construção compreende um elemento de controle que responde a GDF-8 e um gene repórter; (b) adição de uma quantidade da proteína GDF-8 madura ao recipiente de reação suficiente para ativar a expressão do gene repórter; (c) adição de uma quantidade de MYO-029 ao recipiente da etapa (b) suficiente para modular a ativação de GDF-8 do gene repórter; (d) adição de uma amostra biológica ao recipiente de reação da etapa (c); e (e) detecção da expressão do gene repórter na presença e na ausência da amostra biológica.

Em uma modalidade, são fornecidos métodos para a detecção de anticorpos que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica, que compreendem: (a) o contato do agente modulador de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de um agente de detecção ao recipiente de reação; e (d) a detecção de um complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo associado com a superfície do recipiente de reação. Em alguns casos, o agente de detecção é o agente modulador de GDF-8 da etapa (a) e uma marcação detectável. Em alguns casos, o agente de detecção é uma proteína GDF-8 marcada.

Em uma outra modalidade, são fornecidos métodos para a detecção de um anticorpo para um inibidor de GDF-8 em uma amostra biológica. Os métodos compreendem: (a) o contato de um primeiro inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de um segundo inibidor de GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e (d) a detecção do inibidor de GDF-8 marcado associado com a superfície. Em algumas modalidades, o primeiro inibidor de GDF-8 e o segundo inibidor de GDF-8 são os mesmos. Em algumas modalidades, o primeiro inibidor de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente ao GDF-8. Em algumas modalidades, o segundo

inibidor de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente ao GDF-8. Ainda em modalidades adicionais, um inibidor de GDF-8 se liga preferencialmente a GDF-8 em relação a BMP-11.

Em uma modalidade adicional, são fornecidos métodos para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica, que compreende: (a) o contato de MYO-029 isolado com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de MYO-029 marcado ao recipiente de reação; e (d) a detecção de MYO-029 marcado associado com a superfície.

São também fornecidos métodos para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica como uma modalidade específica. Os métodos desta modalidade compreendem: (a) o contato de MYO-029 isolado com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e (d) a detecção do GDF-8 marcado associado com a superfície na presença e na ausência da amostra biológica.

Em uma outra modalidade, são fornecidos métodos para a avaliação da resposta imunológica de um indivíduo a um primeiro inibidor de GDF-8, que compreendem: (a) o contato de um primeiro inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição de uma amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de um segundo inibidor de GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e (d) a detecção de um complexo de segundo inibidor de GDF-8 marcado/anticorpo associado com a superfície, em que a detecção do complexo marcado indica uma resposta imunológica ao primeiro inibidor de GDF-8.

Em uma modalidade adicional, são fornecidos métodos para a avaliação da resposta imunológica de um indivíduo a um primeiro inibidor de GDF-8. Estes métodos compreendem: (a) o contato de um inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de uma proteína GDF-8 mar-

cada ao recipiente de reação; e (d) a comparação da quantidade da proteína GDF-8 marcada associada com a superfície na amostra de teste a uma quantidade da proteína GDF-8 marcada associada com a superfície em uma amostra de controle, em que a detecção de um nível diminuído do complexo marcado na amostra de teste quando comparada com a amostra de controle indica uma resposta imunológica ao inibidor de GDF-8.

Em modalidades particulares, o agente modulador de GDF-8 é escolhido de anticorpo que se liga especificamente a GDF-8, um anticorpo que se liga especificamente a um parceiro de ligação de GDF-8, um receptor solúvel de GDF-8, uma proteína ActRIIB, uma proteína contendo um domínio de folistatina, uma proteína folistatina, uma proteína GASP-1, uma proteína GDF-8, um pró-peptídeo de GDF-8, um inibidor não protéico, um ácido nucléico e uma molécula pequena. Em algumas modalidades preferidas, o agente modulador de GDF-8 é um inibidor de GDF-8. Em algumas modalidades preferidas, o agente modulador de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8 tal como, por exemplo, MYO-029.

Em certas modalidades, a amostra biológica é de um mamífero, ave, réptil ou peixe. Em algumas modalidades preferidas, a amostra biológica é de um ser humano. Em modalidades particulares a amostra biológica é escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândulas mamárias, linfa, urina, suor, fluido lacrimal, fluido gástrico, fluido sinovial e muco. Em algumas modalidades preferidas, a amostra biológica é soro, sangue ou plasma.

Em várias outras modalidades, a marcação é escolhida de uma enzima, uma marcação de epitopo, uma marcação radioativa, biotina, um corante, uma marcação fluorescente e uma marcação luminescente. Em modalidades em que a marcação é uma enzima, os métodos podem ainda compreender a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima. Em modalidades ilustrativas, a marcação é biotina e o método compreende ainda a adição de um conjugado de avidina-enzima. Em uma modalidade específica, o método

compreende ainda a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima.

Aspectos e modalidades adicionais da invenção serão apresentados em parte na descrição a seguir e em parte serão evidentes partindo da descrição ou podem ser aprendidos através da prática da invenção. Não é pretendido que este sumário e a descrição a seguir restrinjam a invenção, como fornecido nas reivindicações.

Breve Descrição das Seqüências

As seqüências de DNA e de aminoácido (AA) de GDF-8, MYO-029 e fragmentos relevantes de scFv, domínios V_H e V_L domains e regiões determinadoras da complementaridade (CDRs) são apresentadas na Listagem de Seqüências e são enumeradas como listado na Tabela 1.

Tabela 1

	SEQ ID Nº
Seqüência madura de aminoácidos de GDF-8 humano	1
Seqüência de aminoácidos do precursor de GDF-8 humano	2
Seqüência de DNA de scFv de MYO-029	3
Seqüência de aminoácidos de scFv de MYO-029	4
Seqüência de DNA de V_H de MYO-029	5
Seqüência de aminoácidos de V_H de MYO-029	6
Seqüência de DNA de V_L de MYO-029	7
Seqüência de aminoácidos de V_L de MYO-029	8
Seqüência de DNA da linhagem germinativa de scFv de MYO-029	9
Seqüência de aminoácidos da linhagem germinativa de scFv de MYO-029	10
Seqüência de DNA da linhagem germinativa de V_H de MYO-029	11
Seqüência de aminoácidos da linhagem germinativa de V_H de MYO-029	12
Seqüência de DNA da linhagem germinativa de V_L de MYO-029	13
Seqüência de aminoácidos da linhagem germinativa de V_L de MYO-029	14
Seqüência de aminoácidos de H1 de MYO-029	15
Seqüência de aminoácidos de H2 de MYO-029	16
Seqüência de aminoácidos de H3 de MYO-029	17
Seqüência de aminoácidos de L1 de MYO-029	18

	SEQ ID Nº
Seqüência de aminoácidos de L2 de MYO-029	19
Seqüência de aminoácidos de L3 de MYO-029	20

Breve Descrição Das Figuras

A figura 1 ilustra uma modalidade do método da invenção, em que o agente modulador de GDF-8 é MYO-029 e o agente de detecção é MYO-029 biotinilado.

A figura 2 ilustra uma modalidade do método da invenção, em que o agente modulador de GDF-8 é MYO-029 e o agente de detecção é GDF-8 biotinilado.

Descrição Detalhada

Esta invenção se refere a métodos para a detecção de anticorpos que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica. Estão incluídos os métodos para a detecção de uma resposta imunológica a um agente modulador de GDF-8. Em particular, são fornecidos aqui métodos para a avaliação de uma resposta imunológica em animais, incluindo seres humanos, a um agente modulador de GDF-8 exógeno, tal como um inibidor de GDF-8. Em uma modalidade, são fornecidos métodos para a detecção da presença de um anticorpo neutralizante para um agente modulador de GDF-8, por exemplo, MYO-029. Em particular, são fornecidos métodos para a avaliação da presença e/ou da quantidade de anticorpos que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica de um indivíduo ao qual o agente modulador de GDF-8 foi administrado.

Quando um agente modulador de GDF-8 é administrado a um indivíduo, os métodos para a detecção de uma resposta imunológica ao agente modulador de GDF-8 administrado são úteis para a determinação da presença e/ou da extensão dos anticorpos que se ligam especificamente ao agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica. Os métodos podem também permitir a avaliação de um regime terapêutico, rastrear o curso da terapia, avaliar a adequabilidade de um agente modulador de GDF-8, identificar um candidato para terapia ou ajustar a dosagem do agente, por exem-

plo. Os métodos podem ainda permitir a identificação de abuso de um agente modulador de GDF-8.

Para que a presente invenção seja mais facilmente entendida, certos termos são definidos aqui. Definições adicionais são apresentadas ao longo de toda a descrição detalhada.

O termo "GDF-8" se refere a um fator de crescimento e de diferenciação específico 8. O termo se refere à forma do precursor não processado de comprimento completo de GDF-8 assim como às formas maduras de de pró-peptídeo resultantes da clivagem pós-tradução. A não ser que seja especificado de outra maneira como "inativa", uma "proteína GDF-8" mantém uma ou mais atividades biológicas de GDF-8. O termo se refere ainda a quaisquer fragmentos e variações de GDF-8 que mantêm pelo menos uma atividade biológica associada com o GDF-8 maduro, como discutido aqui, incluindo seqüências que foram modificadas. A seqüência de aminoácidos de GDF-8 humano maduro é fornecida na SEQ ID Nº: 1 e a seqüência do GDF-8 humano de comprimento completo precursor é fornecida na SEQ ID Nº: 2. A presente invenção se refere a GDF-8 de todas as espécies de vertebrados, incluindo, mas não limitados a ser humano, bovino, galinha, camundongo, rato, suíno, ovino, peru, babuíno e peixe (para informação de seqüência, ver, por exemplo, McPherron e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-12461 (1997)).

O termo "GDF-8 maduro" se refere à proteína que é clivada partindo do domínio carbóxi terminal da proteína precursora de GDF-8. Dependendo das condições, o GDF-8 maduro pode estar presente na forma de um monômero, homodímero e/ou em um complexo latente de GDF-8. Em sua forma biologicamente ativa, o GDF-8 maduro é também referido como "GDF-8 ativo". O termo se refere ainda a quaisquer fragmentos e variações de GDF-8 que mantêm pelo menos uma atividade biológica associada com o GDF-8 maduro, como discutido aqui, incluindo seqüências que foram modificadas.

O termo "pró-peptídeo de GDF-8" se refere ao polipeptídeo que é clivado partindo do domínio amino terminal da proteína precursora de

GDF-8. O propeptídeo GDF-8 é capaz de se ligar ao domínio de ligação do pró-peptídeo no GDF-8 maduro. O pró-peptídeo de GDF-8 forma um complexo com o homodímero maduro de GDF-8. Acredita-se que dois pró-peptídeos de GDF-8 se associam com duas moléculas de GDF-8 maduro no homodímero para formar um complexo tetramérico inativo, chamado de complexo latente. O complexo latente pode incluir outros inibidores de GDF no lugar de ou em adição a um ou mais dos pró-peptídeos de GDF-8.

O termo "atividade de GDF-8" se refere a uma ou mais atividades reguladoras do crescimento ou morfogenéticas fisiológicas associadas com a proteína GDF-8 ativa. Por exemplo, o GDF-8 ativo é um regulador negativo da massa muscular esquelética. O GDF-8 também pode modular a produção de enzimas específicas aos músculos (por exemplo, creatina quinase), estimular a proliferação de mioblastos e modular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. "Atividade de GDF-8" inclui "atividade de ligação ao GDF-8". Por exemplo, o GDF-8 maduro se liga especificamente à região do pró-peptídeo de GDF-8, a ActRIIB, a um receptor de GDF-8, à activina, à folistatina, às proteínas que contêm domínios de folistatina, a GASP-1 e a outras proteínas. Um inibidor de GDF-8, tal como um anticorpo ou uma parte do mesmo, pode reduzir uma ou mais destas atividades de ligação. Os exemplos de procedimentos para medir a atividade de GDF-8 *in vivo* e *in vitro* são apresentados abaixo.

O termo "agente modulador de GDF-8" inclui qualquer agente capaz de modular a atividade, a expressão, o processamento ou a secreção de GDF-8 ou um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo. Os agentes que aumentam uma ou mais atividades de GDF-8 e os agentes que diminuem uma ou mais atividades de GDF-8 são abrangidos pelo termo. O termo "inibidor de GDF-8" inclui qualquer agente capaz de afetar a atividade, a expressão ou o processamento de GDF-8 ou um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo. Um inibidor de GDF-8 reduz uma ou mais atividades associadas a GDF-8. Em certas modalidades, um inibidor de GDF-8 afetará a ligação de GDF-8 a um ou mais de seus parceiros fisiológicos de ligação, incluindo, mas não limitados a um receptor (por exemplo, ActRIIB),

uma proteína contendo domínio de folistatina (por exemplo, folistatina, FLRG, GASP-1, GASP-2) ou uma proteína GDF-8 tal como o pró-peptídeo de GDF-8 e mutantes e derivados dos mesmos. Tais inibidores de GDF-8 incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam especificamente a GDF-8 (incluindo MYO-029, MYO-028, MYO-022, JA-16 e fragmentos e derivados dos mesmos), anticorpos que se ligam especificamente a um receptor de GDF-8 (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.656.475, Pub. de Patente U.S. Nº 2004/0077053-A1), receptores solúveis modificados (incluindo proteínas de fusão com o receptor, tal como a proteína de fusão ActRIIB-Fc), outras proteínas que se ligam especificamente a GDF-8 (tal como o pró-peptídeo de GDF-8, mutantes e derivados do pró-peptídeo de GDF-8, folistatina, proteínas contendo domínio de folistatina e fusões de Fc destas proteínas), proteínas que se ligam ao receptor de GDF-8 e fusões de Fc destas proteínas e imitadores são incluídos. Os inibidores não protéicos (tais como ácidos nucléicos) também são abrangidos pelo termo inibidor de GDF-8. Os inibidores de GDF-8 incluem proteínas, anticorpos, peptídeos, imitadores peptídicos, ribozimas, oligonucleotídeos anti-senso, RNA de filamento duplo, siRNA (por exemplo, para RNAi) e outras moléculas pequenas, que inibem especificamente GDF-8. É dito que tais inibidores "inibem", "reduzem" ou "neutralizam" a atividade biológica de GDF-8 e são descritos em maiores detalhes abaixo.

Um "inibidor de GDF-8" "inibirá", "neutralizará" ou "reduzirá" pelo menos uma atividade biológica de GDF-8, tal como uma atividade fisiológica, reguladora do crescimento ou morfogenética associada com a proteína GDF-8 ativa. Por exemplo, GDF-8 é um regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. Um inibidor de GDF-8 pode aumentar a massa muscular, aumentar a resistência muscular, modular os níveis de enzimas específicas ao músculo (por exemplo, creatina quinase), estimular a proliferação de mioblastos e modular a diferenciação de pré-adipócito em adipócitos, diminuir o acúmulo de gordura, diminuir os níveis de triglicerídeos no soro, diminuir os níveis de colesterol no soro, modular o metabolismo da glicose e reduzir a hiperglicemia. Ainda, GDF-8 bloqueia a expressão induzida pela insulina de GLUT4 e bloqueia a diferenciação mediada pela insulina de

pré-adipócitos.

Os termos "inibir", "inibidor" e seus cognatos se referem a uma redução em uma ou mais atividades de GDF-8 por um inibidor de GDF-8, em relação à atividade de GDF-8 na ausência do mesmo inibidor. A redução na atividade é preferencialmente de pelo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou superior. Em certas modalidades, a atividade de GDF-8, quando afetada por um ou mais dos inibidores divulgados atualmente, é reduzida pelo menos 50%, preferencialmente pelo menos 60%, 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86% ou 88%, mais preferencialmente pelo menos 90%, 92%, 94%, 96%, 98% ou 99% e ainda mais preferencialmente pelo menos 95% até 100% em relação a uma proteína GDF-8 na ausência do inibidor de GDF-8. Os termos "neutralizar", "neutralização" e seus cognatos se referem a uma redução de uma ou mais atividades de GDF-8 em pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95%. A inibição da atividade de GDF-8 pode ser medida em ensaios com o gene repórter pGL3(CAGA)$_{12}$ (RGA) como descrito em Thies e outros, Growth Factors 18: 251-259 (2001) ou em ensaios com o receptor ActRIIB como ilustrado abaixo, por exemplo.

O termo "anticorpo", como utilizado aqui, é qualquer polipeptídeo que compreende um sítio de ligação ao antígeno, tal como uma imunoglobulina ou um fragmento da mesma e abrange qualquer polipeptídeo que compreende um sítio de ligação ao antígeno independente da fonte, da espécie de origem, do método de produção e das características. Como exemplos não limitantes, o termo "anticorpo" inclui anticorpos sintéticos, humanos, de orangotango, macaco, primata, camundongo, rato, cabra, cão, ovelha e galinha. O termo inclui, mas não está limitado a anticorpos policlonais, monoclonais, monoespecíficos, poliespecíficos, inespecíficos, humanizados, de cadeia simples, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados e enxertados com CDR. Para as finalidades da presente invenção, "anticorpo" inclui ainda fragmentos de anticorpo, a não ser que seja citado de outra maneira (tal quando precedido pela palavra "intacto"). Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, F(ab')2, Fv, scFv, Fd, dAb e outros fragmen-

tos de anticorpos que mantêm a função de ligação ao antígeno. Tipicamente, tais fragmentos compreendem um domínio de ligação ao antígeno. Como será reconhecido pelos peritos na técnica, qualquer uma de tais moléculas, por exemplo, um anticorpo "humano", pode ser engenheirado (por exemplo, "de linhagem germinativa") para aumentar sua imunogenicidade, aumentar sua afinidade, alterar sua especificidade ou para outras finalidades.

Os anticorpos podem ser produzidos, por exemplo, através de técnicas tradicionais de hibridoma (Kohler e outros, Nature 256: 495-499 (1975)), métodos do DNA recombinante (Patente U.S. Nº 4.816.567) ou técnicas de exibição por fagos utilizando bibliotecas de anticorpos (Clackson e outros, Nature 352: 624-628 (1991); Marks e outros, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)). Para várias outras técnicas de produção de anticorpo, ver Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow e outros, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

O termo "domínio de ligação ao antígeno" se refere à parte de uma molécula de anticorpo que compreende a área que se liga especificamente a ou é complementar a uma parte ou todo um antígeno. Quando o antígeno for grande, um anticorpo pode se ligar apenas a uma parte particular do antígeno. O "epitopo" ou o "determinante antigênico" é uma parte de uma molécula de antígeno que está envolvida em interações específicas com o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo. Um domínio de ligação ao antígeno pode ser fornecido por um ou mais domínios variáveis do anticorpo (por exemplo, um fragmento de anticorpo Fd que consiste em um domínio V_H). Em certas modalidades, um domínio de ligação ao antígeno compreende uma região variável de cadeia leve do anticorpo (V_L) e uma região variável de cadeia pesada do anticorpo (V_H) (Patente U.S. Nº 5.565.332).

Os termos "ligação específica", "se liga especificamente" e similares, significam que duas ou mais moléculas formam um complexo que pode ser medido sob condições fisiológicas ou de ensaio e é seletivo. É dito que um anticorpo ou outro inibidor "se liga especificamente" a uma proteína se, sob condições selecionadas apropriadamente, tal ligação não for subs-

tancialmente inibida, enquanto que ao mesmo tempo a ligação inespecífica é inibida. A ligação específica é caracterizada por uma afinidade relativamente alta e é seletiva para o composto ou para a proteína. A ligação inespecífica geralmente possui uma afinidade baixa. Tipicamente, a ligação é considerada específica quando a constante de afinidade K é de pelo menos aproximadamente 10^6 M^{-1} ou preferencialmente de pelo menos aproximadamente 10^7, 10^8, 10^9 ou 10^{10} M^{-1}. Certos métodos requerem alta afinidade para ligação específica, enquanto que outros métodos, tal como um ensaio de ressonância de plasmon de superfície, pode detectar complexos menos estáveis e interações com afinidades menores. Se necessário, a ligação inespecífica pode ser reduzida sem afetar substancialmente a ligação específica variando as condições de ligação. Tais condições são conhecidas na técnica e um perito na técnica utilizando técnicas de rotina podem selecionar condições apropriadas. As condições são geralmente definidas em termos de concentração dos parceiros de ligação, força iônica da solução, temperatura, tempo permitido para a ligação, concentração de moléculas não relacionadas (por exemplo, albumina do soro, caseína do leite) etc. Os exemplos de condições de ligação são apresentados nos Exemplos.

O termo "isolada" se refere a uma molécula que está substancialmente livre de seu ambiente natural. Por exemplo, uma proteína isolada é substancialmente livre de material celular ou outras proteínas da célula ou da origem de tecido da qual é derivada. O termo se refere a preparações em que a proteína isolada está substancialmente pura para ser administrada como uma composição terapêutica ou pelo menos 70% até 80% (p/p) pura, mais preferencialmente, pelo menos 80%-90% (p/p) pura, ainda mais preferencialmente, 90-95% pura; e, mais preferencialmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% (p/p) pura.

O termo "indivíduo" se refere a qualquer animal vertebrado, incluindo um mamífero, uma ave, um réptil, um anfíbio ou um peixe. O termo "mamífero" inclui qualquer animal classificado como tal, do sexo masculino ou feminino, incluindo seres humanos, primatas não humanos, macacos, cães, cavalos, gatos, ovelha, porcos, cabras, gado etc. Os exemplos de a-

nimais que não são mamíferos incluem galinha, peru, pato, ganso, peixe, salmão, bagre, garoupa, sapo e truta. Um indivíduo pode ser escolhido de seres humanos, animais atletas ou domésticos, de gado, de zoológico, de esporte, de corrida ou de companhia, por exemplo.

O termo "dose eficaz" ou "quantidade eficaz" se refere a uma dosagem ou a um nível que é suficiente para melhorar sintomas clínicos ou atingir um resultado biológico desejado (por exemplo, o aumento da massa muscular, da resistência muscular e/ou da densidade óssea) nos indivíduos, incluindo indivíduos que possuem um distúrbio associado a GDF-8. Tal quantidade deve ser suficiente para reduzir a atividade de GDF-8 associada com a regulação negativa da massa muscular esquelética e da densidade óssea, por exemplo. Os resultados terapêuticos e os sintomas clínicos podem incluir a redução na gordura do corpo, aumentar a massa muscular, indicadores cardiovasculares melhores ou regulação melhorada do metabolismo da glicose. Um inibidor de GDF-8 pode aumentar a massa muscular, a resistência muscular, modular os níveis de enzimas específicas dos músculos (por exemplo, creatina quinase) e/ou estimular a proliferação de mioblastos, por exemplo. Em uma modalidade preferida, um inibidor de GDF-8 reduz as manifestações clínicas de um distúrbio associado com GDF-8. Um agente modulador de GDF-8 pode modular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, diminuir o acúmulo de gordura, diminuir os níveis de triglicerídeos no soro, diminuir os níveis de colesterol no soro, modular o metabolismo da glicose, modular a densidade óssea e reduzir a hiperglicemia, por exemplo. Um inibidor de GDF-8 também pode ser administrado a um indivíduo para aumentar a massa muscular, aumentar o desempenho atlético ou aumentar ou acelerar o crescimento, incluindo o crescimento muscular. A quantidade eficiente pode ser determinada como descrito nas secções subseqüentes. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um inibidor de GDF-8 se refere a uma quantidade que é eficiente, após a administração de doses isoladas ou múltiplas a um indivíduo (tal como um ser humano) no tratamento, na prevenção, na cura, no retardo, na redução da gravidade ou na melhora de pelo menos um sintoma de um distúrbio ou distúrbio recorrente ou no pro-

longamento da sobrevivência do indivíduo além do esperado na ausência de tal tratamento.

Um "distúrbio associado a GDF-8" é um distúrbio ou um estado de saúde em que um indivíduo se beneficiaria da administração de um modulador de GDF-8, tal como um inibidor de GDF-8. Um distúrbio associado a GDF-8 inclui um distúrbio médico tal como um distúrbio ou um estado de saúde relacionado aos músculos ou neuromuscular ou um distúrbio ou estado de saúde relacionado ao tecido adiposo, metabólico ou ao osso.

A administração de um inibidor de GDF-8 pode ser "terapêutica" quando o inibidor é administrado a um indivíduo para tratar um distúrbio, que inclui a melhora e/ou a prevenção de sintomas ou do distúrbio. Os usos terapêuticos incluem a administração de um agente modulador de GDF-8 a um indivíduo que possui um distúrbio médico ou que finalmente pode adquirir o distúrbio, com a finalidade de prevenir, curar, retardar, reduzir a gravidade ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio ou distúrbio recorrente ou para prolongar a sobrevivência de um indivíduo além da esperada na ausência de tal tratamento. Um inibidor de GDF-8 pode aumentar a massa muscular, a resistência muscular, modular os níveis de enzimas específicas ao músculo (por exemplo, creatina quinase) e estimular a proliferação de mioblastos, por exemplo. Um agente modulador de GDF-8 pode modular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, diminuir o acúmulo de gordura, diminuir os níveis de triglicerídeos no soro, diminuir os níveis de colesterol no soro, modular o metabolismo da glicose, modular a densidade óssea e reduzir a hiperglicemia, por exemplo. Um inibidor de GDF-8 também pode ser administrado a um indivíduo para aumentar a massa muscular, para aumentar o desempenho atlético ou aumentar ou acelerar o crescimento, incluindo o crescimento muscular.

O termo "altamente rigorosa" ou "alto rigor" descreve as condições para a hibridização e para a lavagem utilizadas para a determinação das interações ácido nucléico-ácido nucléico. Tais condições são conhecidas pelos peritos na técnica e podem ser encontradas, por exemplo, em Wiley e outros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.,

6.3.1-6.3.6 (1989). Podem ser utilizadas tanto condições aquosas quanto não aquosas que são descritas na técnica. Um exemplo de condições de hibridização altamente rigorosas é a hibridização em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por pelo menos uma lavagem em 0,2X SSC, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 50°C. Outros exemplos de condições de hibridização altamente rigorosas incluem a hibridização em 6X SSC a aproximadamente 45°C (ou 50°C, 60°C ou 65°C) seguida por pelo menos uma lavagem em 0,2X SSC, 0,1% de SDS a aproximadamente 55°C, 60°C ou 65°C. As condições altamente rigorosas podem ainda ser a hibridização em 0,5 M de fosfato de sódio, 7% de SDS a 65°C, seguida por pelo menos uma lavagem a 0,2X SSC, 1% de SDS a 65°C (ver ainda, por exemplo, Sambrook e outros, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

A expressão "substancialmente idêntica" ou "substancialmente similar" significa que a seqüência de aminoácidos ou de nucleotídeos relevante, tal como dos inibidores de GDF-8 da invenção, será idêntica ou terá diferenças não substanciais (através de substituições conservadas de aminoácidos) em comparação com as seqüências que são divulgadas. Os nucleotídeos e os polipeptídeos da invenção incluem, por exemplo, os que são pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticos em seqüência às moléculas de ácidos nucléicos e aos polipeptídeos divulgados.

Para os polipeptídeos, pelo menos 20, 30, 50, 100 ou mais aminoácidos serão comparados entre o polipeptídeo original e o polipeptídeo variante que é substancialmente idêntico ao original. Para os ácidos nucléicos, pelo menos 50, 100, 150, 300 ou mais nucleotídeos serão comparados entre o ácido nucléico original e o ácido nucléico variante que é subseqüentemente idêntico ao original. Assim, um variante poderia ser substancialmente idêntico em uma região ou regiões, mas divergente em outras, enquanto ainda satisfaz a definição de "substancialmente idêntico". A porcentagem de identidade entre duas seqüências é determinada por algoritmos padronizados de alinhamento tais como, por exemplo, Basic Local Alignment Tool

(BLAST) descrito em Altschul e outros, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990), o algoritmo de Needleman e outros, J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970) ou o algoritmo de Meyers e outros, Comput Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988).

O termo "variante" se refere a seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos que são substancialmente idênticas ou similares às seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, por exemplo, dos inibidores de GDF-8 fornecidos, respectivamente. As variantes podem ser naturalmente ocorrentes, por exemplo, seqüências de nucleotídeos humanas e não humanas que ocorrem naturalmente ou são geradas artificialmente. Os exemplos de variantes são aqueles que resultam do processamento alternativo do mRNA, incluindo variantes processadas tanto a 3' quanto a 5', mutações pontuais e outras mutações ou clivagem proteolítica das proteínas. As variantes incluem moléculas de ácidos nucléicos ou fragmentos das mesmas e seqüências de aminoácidos e fragmentos das mesmas, que são substancialmente idênticas ou similares a outras seqüências de ácidos nucléicos (ou seus filamentos complementares quando estão alinhados de forma ótima (com inserções ou deleções apropriadas)) ou de aminoácidos, respectivamente. Em uma modalidade, há pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade entre uma molécula de ácido nucléico ou uma proteína da invenção e uma outra molécula de ácido nucléico ou uma proteína, respectivamente, quando alinhadas de forma ótima. Adicionalmente, as variantes incluem proteínas ou polipeptídeos que exibem atividade de GDF-8 ou inibem a atividade de GDF-8, como discutido neste pedido de patente.

Uma "amostra biológica" é o material biológico coletado de um indivíduo, tais como células, tecidos, órgãos ou fluidos. Os exemplos de amostras biológicas incluem soro, sangue e plasma.

O termo "recipiente de reação" se refere a um recipiente em que um ensaio *in vitro* tal como uma reação de associação entre um agente modulador de GDF-8 e um anticorpo pode ocorrer e ser detectada. Uma "superfície" é a parte externa de qualquer sólido (tal como, por exemplo, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila, sulfato de

dextran ou polipropileno tratado) a qual um agente modulador de GDF-8 pode ser diretamente ou indiretamente "colocado em contato", "imobilizado" ou "revestido". Uma "superfície de um recipiente de reação" pode ser uma parte do próprio recipiente ou a superfície pode estar dentro do recipiente de reação. Uma superfície tal como poliestireno, por exemplo, pode ser submetida ao tratamento químico ou de radiação para alterar as propriedades de ligação de sua superfície. Superfícies de ligação ao meio, de alta ligação, aminadas e ativadas são abrangidas pelo termo. Um agente modulador de GDF-8 pode ser colocado diretamente em contado uma superfície, por exemplo, através de adsorsão física ou ligação covalente à superfície ou pode ser colocado indiretamente em contato, por exemplo, através de uma interação com uma substância ou um grupamento que é colocado diretamente em contato com a superfície.

O termo "agente de captura" como utilizado aqui, se refere à molécula, tal como uma proteína, por exemplo, que é utilizada em um ensaio imunológico para se ligar especificamente a uma proteína alvo, tal como um agente modulador de GDF-8 ou o próprio GDF-8. Um agente de captura adequado para os presentes métodos se liga especificamente ao agente modulador de GDF-8 e/ou à proteína GDF-8. Por exemplo, um agente de captura pode ser a proteína GDF-8, incluindo um dímero maduro de GDF-8 ou uma proteína que se liga especificamente a uma proteína GDF-8. Similarmente, um agente de captura pode ser um agente modulador de GDF-8 ou uma proteína que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8.

Um "agente de detecção" é uma proteína ou uma molécula pequena que se liga especificamente a um anticorpo para um agente modulador de GDF-8. Um agente de detecção pode compreender opcionalmente uma marcação que pode ser detectada. Um agente de detecção pode ainda por si só ser detectado por um agente de detecção que compreende uma marcação que pode ser detectada. O termo "marcação" se refere a uma molécula que, por sua natureza química, fornece um sinal que pode ser analiticamente identificado que permite a detecção de uma interação molecular.

Uma proteína, incluindo um anticorpo, possui uma marcação que pode ser detectada se estiver ligada covalentemente ou não covalentemente a uma molécula que pode ser detectada diretamente (por exemplo, através de um cromóforo, fluoróforo ou radioisótopo) ou indiretamente (por exemplo, através da catálise de uma reação que produz um produto colorido, luminescente ou fluorescente).

A presente invenção se refere a métodos para a detecção de uma resposta imunológica a um agente modulador de GDF-8 assim como a métodos para a detecção de anticorpos para um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica. Em uma modalidade, os métodos detectam anticorpos, em particular, anticorpos capazes de se ligarem aos constituintes de agentes moduladores de GDF-8 terapêuticos *in vitro*, incluindo inibidores de GDF-8. Em algumas modalidades, os ensaios detectam anticorpos neutralizadores, tais como anticorpos que inibem a ação do agente modulador de GDF-8. Em uma modalidade particular, os ensaios detectam anticorpos que inibem a ligação de MYO-029 ao GDF-8. Os métodos são úteis na avaliação da adequabilidade de pacientes humanos de receberem anticorpos terapêuticos ou outros agentes moduladores de GDF-8, por exemplo, que inibem uma atividade biológica de GDF-8. Em uma modalidade específica, os métodos detectam a presença de anticorpos em uma amostra biológica para MYO-029.

Um indivíduo com um distúrbio associado a GDF-8, um indivíduo em risco de desenvolver um distúrbio associado a GDF-8, um indivíduo sofrendo terapia com um agente modulador de GDF-8 e um indivíduo que é um candidato para a administração de um agente modulador de GDF-8, podem ser um cadidato para os métodos fornecidos aqui. Os métodos da invenção podem detectar ou prevenir uma resposta imunológica deletéria e/ou avaliar a eficiência, a estabilidade biológica ou a adequabilidade de utilização de um agente modulador de GDF-8.

Um indivíduo que possui ou está em risco de desenvolver um distúrbio associado a GDF-8 tal como um distúrbio relacionado aos músculos ou um distúrbio neuromuscular é um candidato para os métodos forneci-

dos aqui. A inibição da atividade de GDF-8 aumenta o tecido muscular nos indivíduos, incluindo aqueles que estão sofrendo de distúrbios relacionados com os músculos. Um número de distúrbios está associado com o tecido muscular ou nervoso funcionalmente prejudicado, por exemplo, distrofias musculares, esclerose lateral amiotrófica (ALS), sarcopenia, caquexia, desgaste muscular, atrofia muscular ou degeneração muscular, incluindo desgaste, atrofia ou fraqueza. As distrofias musculares incluem, por exemplo, distrofias musculares pseudohipertróficas, facioscapuloumeral e de cintura de membros. Os exemplos de distrofias musculares incluem distrofia muscular de Duchenne (Leyden-Möbius), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular da cintura dos membros, síndrome da espinha rígida, síndrome de Ullrich, distrofia muscular de Fukuyama, síndrome de Walker Warburg, doença cerebral do músculo ocular, distrofia muscular facioscapuloumeral (Landouzy-Dejerine), distrofia muscular congênita, distrofia miotônica (doença de Steinert), miotonia congênita e doença de Gowers.

Um distúrbio muscular associado a GDF-8 inclui ainda um distúrbio escolhido da degeneração muscular associada com doença cardiovascular ou secundária a uma outra doença ou estado de saúde tal como atrofia de um órgão, falência de um órgão, câncer, Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), repouso na cama, imobilização, ausência prolongada de uso ou outra doença ou estado de saúde é também incluído no termo.

Um indivíduo que possui ou está em risco de desenvolver distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade), distúrbios cardiovasculares (quando associados com a perda muscular ou atrofia muscular) e distúrbios do metabolismo da insulina pode ser um candidato. Similarmente, os indivíduos que possuem ou estão em risco de desenvolver um distúrbio associado com uma perda óssea, incluindo osteoporose, especialmente em mulheres idosas e/ou pós-menopausa, osteoporose induzida por glicocorticóides, osteopenia, osteoartrite e fraturas relacionadas à osteoporose são candidatso para os métodos contidos aqui. Outros estados de saúde associados a GDF-

8 incluem doenças ósseas metabólicas e distúrbios caracterizados por pouca massa óssea, tais como os causados pela terapia crônica com glicocorticóides, falência gonadal pré-matura, supressão de androgênio, deficiência de vitamina D, hiperparatiroidismo secundário, deficiências nutricionais e anorexia nervosa.

Os exemplos de distúrbios cardiovasculares incluem doença da artéria coronária (aterosclerose), angina (incluindo angina aguda e angina instável), ataque cardíaco, derrame (incluindo derrame isquêmico), doenças cardiovasculares associadas à hipertensão, falência cardíaca, falência cardíaca congestiva, doença da artéria coronária, hipertensão, hiperlipidemia, doença arterial periférica e doença vascular periférica. Os exemplos de distúrbios do metabolismo da insulina incluem estados de saúde associados com homeostase aberrante da glicose, diabetes do tipo 2, pré-diabetes, tolerância prejudicada à glicose, deslipidemia, síndrome metabólica (por exemplo, síndrome X) e resistência à insulina induzida por trauma tais como queimaduras ou desequilíbrio de nitrogênio.

Ainda, um indivíduo que deseja aumentar a massa muscular ou a resistência muscular, por exemplo, para aumentar o desempenho atlético ou aumentar o crescimento ou a massa do tecido muscular em animais do gado, é um candidato para um método fornecido aqui. Um indivíduo que exibe um aumento na massa muscular, tal como um aumento no tamanho das células musculares (hipertrofia) ou no número de células musculares (hiperplasia) pode ser um candidato para um método para a detecção de um anticorpo para um agente modulador exógeno de GDF-8. O aumento pode ser nas fibras musculares do tipo 1 e/ou do tipo 2 de um mamífero ou outro animal. Os métodos para medir um aumento na massa muscular são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o músculo pode ser medido antes e depois da administração de um agente modulador de GDF-8 utilizando técnicas padronizadas tais como a pesagem sob a água. Um aumento no tamanho do músculo pode ser evidenciado pelo ganho de peso de pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 20% ou mais.

Em uma modalidade, a presente invenção compreende um mé-

todo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica de pelo menos um indivíduo, que compreende as etapas de: (a) adição do agente modulador de GDF-8 a um ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 em um recipiente de reação; (b) adição da amostra biológica ao ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 no recipiente de reação; (c) detecção da modulação da atividade de GDF-8 pela amostra biológica; e (d) comparação da modulação da atividade de GDF-8 na presença da amostra biológica com a modulação da atividade de GDF-8 na presença do agente modulador de GDF-8 isoladamente. Em certas modalidades, o ensaio *in vitro* para a detecção da ligação do anticorpo para o agente de GDF-8, por exemplo, em um formato de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Em uma modalidade, a ligação ao agente de GDF-8 é detectada com um agente de detecção que é o agente modulador de GDF-8 com uma marcação que pode ser detectada. Em uma outra modalidade, o agente de detecção é uma proteína GDF-8 marcada. Em uma outra modalidade, o ensaio *in vitro* é um ensaio com base em células para a atividade de GDF-8 tal como, por exemplo, um ensaio com gene repórter.

Em certas modalidades, o ensaio *in vitro* mede uma ou mais atividades fisiológicas reguladoras do crescimento ou morfogenéticas associadas com a proteína GDF-8 ativa. Os ensaios *in vitro* para a detecção da modulação de uma atividade de GDF-8 podem ser escolhidos de um ensaio com base em células ou um ensaio isento de células (tal como, por exemplo, um ensaio para medir a modulação da transcrição, da replicação ou da interrupção do ciclo celular) ou um ensaio de ligação (tal como, por exemplo, um ensaio imunológico, um ensaio de ressonância de plasmon de superfície, um ensaio de imunoprecipitação ou um ensaio radioimune). Por exemplo, o GDF-8 ativo é um regulador negativo da massa muscular esquelética, modula a produção de enzimas específicas aos músculos (por exemplo, creatina quinase), estimula a proliferação de mioblastos e modula a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Em alguns métodos, é realizada a seleção de agentes moduladores de GDF-8 de agentes moduladores de BMP-11. Os

ensaios com base em células ou isentos de células para uma atividade de GDF-8 são conhecidos na técnica e estão descritos infra.

Ensaios de Ligação

Em uma modalidade, a presente invenção compreende um método para a detecção da presença de um anticorpo em uma amostra biológica selecionada de uma ou mais amostras de pacientes, que compreende as etapas a seguir: (a) o contato do agente modulador de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de um agente de detecção ao recipiente de reação; e (d) a detecção de um complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo associado com a superfície do recipiente de reação. São apresentadas duas modalidades nas Figuras 1 e 2.

Na etapa (a) de certas modalidades, o agente modulador de GDF-8 é colocado em contato com a superfície de um recipiente de reação, por exemplo, estando ligado covalentemente ou não covalentemente à superfície. O conteto pode ser direto ou indireto. A superfície sólida é tipicamente vidro ou um polímero, tal como, por exemplo, celulose, sulfato de dextran, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila ou polipropileno e pode estar na forma de uma esfera, incluindo uma esfera magnética ou paramagnética. A superfície pode ser modificada, por exemplo, por tratamento químico ou de radiação para afetar as características de ligação da superfície. A imobilização dos ligantes na superfície pode ser conseguida através de interações covalentes ou não covalentes, tal como a adsorção física. Um agente modulador de GDF-8, por exemplo, MYO-029, pode ser adsorvido diretamente na superfície de um recipiente de reação. Em outras modalidades, um agente modulador de GDF-8 pode estar associado com uma superfície do recipiente de reação através da interação de uma molécula de biotina, ligada covalentemente ao agente, com uma molécula de avidina, colocada em contato com a superfície do recipiente de reação. Os métodos de ligação covalente incluem o acoplamento com um agente de reticulação tal como glutaraldeído, isocianato de hexametileno, um agente contendo sulfo, um peptídeo, um agente alquilante ou um reagente similar. Em algu-

mas modalidades preferidas, o agente modulador de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8, um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a GDF-8, um anticorpo neutralizante para GDF-8, MYO-029, MYO-028, MYO-022 ou JA-16 ou um fragmento de qualquer um dos mesmos. As características estruturais e funcionais destes inibidores de GDF-8 são apresentadas, por exemplo, nas Pub. de Patentes U.S. Nºs 2004/0142382-A1 e 2003/0138422-A1 e tais partes são especificamente incorporadas aqui como referência, em adição à incorporação dos documentos inteiros. Em particular, as características de certos anticorpos neutralizantes, incluindo MYO-029, estão descritas na Pub. de Patente U.S. Nº 2004/0142382-A1 nos parágrafos 54-90 e nas reivindicações 1-42. Similarmente, os anticorpo inibidores da Pub. de Patente U.S. Nº 2003/0138422-A1, estão descritos nos parágrafos 56-70, 93-110 e nas reivindicações 1-54.

Em certas modalidades, após colocar em contato o agente modulador de GDF-8 com a superfície do recipiente de reação, o recipiente de reação é lavado para remover o agente modulador de GDF-8 não ligado antes da adição da amostra biológica. As interações inespecíficas são minimizadas com uma etapa de bloqueio, em que um tampão que compreende pelo menos um agente de bloqueio, tal como uma proteína que não se liga especificamente ao alvo, é adicionado ao recipiente de reação. Em outras modalidades, podem ser adicionados detergentes, tais como detergentes iônicos ou não iônicos. Os tampões de bloqueio podem compreender soro, albumina do soro bovino, leite, caseína, gelatina e/ou detergentes não iônicos, por exemplo. Em algumas modalidades o recipiente de reação é lavado com um tampão com pH entre aproximadamente 5 e pH aproximadamente 9, tal como tampão citrato, tampão fosfato, tampão Tris ou tampão acetato,

Certas modalidades compreendem a etapa (b), em que uma amostra biológica é adicionada ao recipiente de reação. A amostra biológica que será testada pode ser escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândula mamária, linfa, urina, suor e fluido lacrimal. Em modalidades preferidas, a a-

mostra biológica é um fluido. Em algumas modalidades preferidas, a amostra biológica é escolhida de sangue, soro e plasma. Em modalidades específicas, a amostra biológica é soro, tal como soro humano, de macaco, de rato ou de camundongo.

Em outras modalidades, a amostra biológica é isolada de um indivíduo ou indivíduos e opcionalmente tratada antes do teste. A amostra biológica pode ser utilizada como coletada ou após uma diluição com um diluente adequado. As diluições são otimizadas para reduzir e/ou eliminar a interferência da matriz com o ensaio. O diluente não é particularmente restrito, mas pode compreender água deionizada ou vários tampões que possuem uma ação tamponante dentro da faixa de aproximadamente pH 5 até aproximadamente pH 9, preferencialmente aproximadamente pH 6,5 até aproximadamente pH 8,5, (por exemplo, tampão citrato, tampão fosfato, tampão Tris, tampão acetato ou tampão borato). Em algumas modalidades preferidas, o diluente compreende soro humano normal. O diluente pode compreender uma concentração constante de uma amostra biológica de controle, escolhida para corresponder à amostra biológica de teste, por exemplo, para controlar os efeitos de fundo ou a interferência da matriz de amostra.

Em uma modalidade, uma amostra de teste de soro humano é diluída em tampão THST (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 1,0 mM de glicina, 0,5 M de NaCl e 0,05% (v/v) de Tween 20®) 1:8 vezes e diluições da amostra de teste além de 8 vezes são preparadas em THST mais 12,5% de soro humano. Uma amostra pode ser diluída aproximadamente 2, 4, 8, 16, 32, 64 ou 128 vezes. Em outras modalidades, uma amostra de teste é diluída em série 1:1,5 ou 1:1,6 para a obtenção de uma faixa de pontos de dados que permite a verificação da linearidade das diluições e os efeitos da matriz. Para as matrizes das amostras biológicas, uma diluição pode ser selecionada em cuja interferência da matriz e sensibilidade do ensaio são otimizadas.

Em algumas modalidades, a amostra pode ser opcionalmente fracionada ou concentrada utilizando métodos bem conhecidos e então adicionada a um método fornecido aqui para a detecção de um agente modulador de GDF-8. O fracionamento (incluindo a purificação) ou a concentração

pode ser utilizada, por exemplo, se a interferência da matriz limitar a detecção de um agente modulador de GDF-8 no ensaio. As técnicas de fracionamento e de concentração, incluem, mas não estão limitadas à centrifugação, à precipitação com sulfato de amônio, à precipitação com polietileno glicol, à precipitação com o ácido tricloroacético (TCA), às técnicas de afinidade (tal como a imunoprecipitação com uma resina conjugada com um parceiro de ligação específico tal como um anticorpo, isto é, um anticorpo anti-Fc humano, proteína A ou proteína G, por exemplo), às técnicas cromatográficas e a outras técnicas de separação. Em modalidades preferidas, a amostra biológica não é fracionada ou concentrada antes da detecção de um agente modulador de GDF-8.

Uma amostra biológica pode ser coletada de um indivíduo que nunca recebeu tratamento ou uma amostra pode ser tirada antes, durante ou depois da administração de um agente modulador de GDF-8. Por exemplo, uma amostra pode ser obtida de um indivíduo 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ou mais dias após a administração de um agente modulador de GDF-8. Uma amostra também pode ser obtida 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16 ou mais semanas após a administração de um agente modulador de GDF-8. Uma vez que quantidades substanciais do agente modulador de GDF-8 circulante pode compreender a detecção dos anticorpos para o agente em certas modalidades dos métodos fornecidos aqui (ver, por exemplo, o Exemplo 7), a sincronia da coleta das amostras pode ser otimizada para reduzir a interferência de um agente modulador de GDF-8. A persistência da resposta de um anticorpo é também testada através da verificação dos pontos de tempo estendidos. Em alguns casos, os pontos de tempo de até um ano ou além são apropriados.

Em certas modalidades, uma alíquota da amostra que será tratada é colocada em contato com o antígeno imobilizado e incubada durante um período de tempo suficiente (por exemplo, 2-120 minutos, 1-4 horas) e sob condições adequadas (por exemplo, 23°C) para permitir a ligação de qualquer anticorpo para o agente modulador de GDF-8 presente na amostra e para permitir que o complexo de anticorpo/agente modulador de GDF-8 se

forme. Em outras modalidades, a reação do agente modulador de GDF-8/anticorpo não é particularmente restrita, mas pode ser conduzida sob as condições no uso de rotina para ensaios imunológicos convencionais. Um procedimento típico compreende a incubação ou permitir que um sistema de reação fique em repouso compreendendo o anticorpo e o agente modulador de GDF-8 geralmente a uma temperatura não superior a 45°C, preferencialmente entre aproximadamente 4°C e aproximadamente 40°C, mais preferencialmente entre aproximadamente 23°C e aproximadamente 40°C durante entre aproximadamente 0,5 e 40 horas, preferencialmente entre aproximadamente 1 e aproximadamente 20 horas. Em modalidades preferidas, o tampão de reação é selecionado para evitar a interferência com a reação ou a detecção da mesma. Portanto, as modalidades incluem, mas não estão limitadas a tampões entre aproximadamente pH 5 e aproximadamente pH 9, tal como tampão citrato, tampão fosfato, tampão Tris e tampão acetato.

Em certas modalidades, a etapa (c) compreende a adição de um agente de detecção ao recipiente de reação. Após o período de incubação, o anticorpo imobilizado para o agente modulador de GDF-8 é, em algumas modalidades, lavado com tampão para remover solutos não ligados antes da etapa (c). Em outras modalidades é realizado um ensaio simultâneo, em que as etapas (b) e (c) ocurrem concorrentemente.

Em modalidades particulares, em que a etapa (c) é conduzida após a etapa (b), um procedimento pode compreender a incubação ou permitir o repouso de um sistema de reação que compreende o anticorpo e o agente de detecção geralmente a uma temperatura não superior a 45°C, preferencialmente entre aproximadamente 4°C e aproximadamente 40°C, mais preferencialmente entre aproximadamente 25°C e aproximadamente 40°C durante entre aproximadamente 0,5 e 40 horas, preferencialmente entre aproximadamente 1 e aproximadamente 20 horas. Em certas modalidades, o tampão de reação é selecionado de forma que não interfira com a reação ou com a detecção da mesma. Portanto, as modalidades incluem, mas não estão limitadas a tampões entre aproximadamente pH 5 e aproximadamente pH 9, tal como tampão citrato, tampão fosfato, tampão Tris e

tampão acetato.

Em certas modalidades, o agente de detecção é uma molécula que se liga especificamente a um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8. Em algumas modalidades, o agente de detecção compreende uma marcação que pode ser detectada. Os agentes de detecção preferidos incluem certas imunoglobulinas e reagentes capazes de se ligar às seqüências de imunoglobulinas humanas (incluindo anticorpos anti-humanos de cabra, proteína A, proteína G etc.), por exemplo, uma parte constante da imunoglobulina. As imunoglobulinas que se ligam especificamente a um agente modulador de GDF-8 são incluídas. Uma vez que MYO-029 é uma IgG1 humana com uma cadeia leve lambda, em várias modalidades, os agentes de detecção incluirão reagentes capazes de se ligar às imunoglobulinas humanas com cadeias leves lambda. Em outras modalidades, é incluído um agente que se liga a uma imunoglobulina IgG1 não humana com cadeias leves lambda. Em várias modalidades, a detecção é qualitativa ou é quantitativa. Em algumas modalidades, a marcação poderá ser detectada através de meios visuais sem o auxílio de instrumentos.

Em uma modalidade preferida, o agente de detecção tal como MYO-029 ou o dímero de GDF-8 maduro está biotinilado. A proteína GDF-8 madura funcional, por exemplo, pode ser biotinilada com reagentes específicos à amina que são apresentados no Exemplo 12. Similarmente, em uma preparação alternativa, a proteína GDF-8 no complexo latente é produzida e isolada de acordo com o ensaio do Exemplo 1 da Pub. da Patente U.S. Nº 2004/0142382 A1. O complexo latente é subseqüentemente biotinilado utilizando técnicas bem conhecidas e/ou que são descritas aqui.

O GDF-8 maduro é inesperadamente sensível à biotinilação dos grupos amina primários, tal como nos resíduos de lisina. O GDF-8 hiperbiotinilado, quando biotinilado com reagentes de biotinilação específicos, é menos ativo ou inativado quando comparado com o GDF-8 sem biotina. Para manter a proteína GDF-8 madura funcional após a biotinilação, foi observado que a quantidade de biotina incorporada na preparação do GDF-8 maduro nos grupos amina é crítica. Por exemplo, as atividades de ligação de MYO-

029 e ActRIIB são reduzidas nas preparações hiperbiotiniladas. Portanto, são preferidas as preparações de GDF-8 maduro biotinilado na amina possuindo menos que cinco mols de biotina por mol do dímero de GDF-8. Em modalidades alternativas, as proteínas podem ser biotiniladas em sulfidrilas, carboxilas e/ou carboidratos. Os compostos de biotina fotorreativos que se ligam inespecificamente ou reagem após a fotoativação também estão disponíveis.

Em certos métodos fornecidos aqui, o GDF-8 é biotinilado com um reagente de biotinilação específico à amina como um complexo latente e subseqüentemente o GDF-8 é isolado do complexo. Nestes métodos, a quantidade de biotina incorporada no dímero de GDF-8 maduro é otimizada para manter a atividade biológica, por exemplo, para evitar a inativação do sítio de ligação do receptor. A proteína GDF-8 também pode ser biotinilada nos resíduos de cisteína da superfície (ou grupos tiol da superfície) utilizando um reagente de biotinilação específico à sulfidrila. Adicionalmente, os métodos para a biotinilação de carboidratos envolvendo um pré-tratamento oxidativo para gerar aldeídos reativos e o uso de reagentes de hidrazida de biotina, são conhecidos na técnica e podem ser otimizados para as proteínas descritas aqui, incluindo para a proteína GDF-8 madura, otimamente na forma modificada. Ainda, podem ser utilizados os reagentes e as reações de biotinilação reativas ao carboxila que permite a biotinilação através de resíduos de aspartato e glutamento, por exemplo. Como seria evidente para um perito na técnica, as proporções molares ótimas de biotina em relação ao dímero de GDF-8 variarão com o procedimento e o reagente de biotinilação utilizados. Por exemplo, um perito na técnica considerará como otimizar uma preparação de GDF-8 biotinilado ativo utilizando os métodos descritos aqui em combinação com procedimentos de biotinilação conhecidos, para a produção de uma proteína GDF-8 madura biotinilada que possui proporções molares ótimas diferentes de biotina em relação ao dímero de GDF-8, enquanto mantém pelo menos uma atividade de GDF-8.

Vários reagentes de biotinilação são capazes de marcar eficientemente as proteínas, incluindo um complexo latente de GDF-8. As propor-

ções molares de derivado de biotina em relação ao complexo latente de GDF-8 na reação podem ser de aproximadamente 10, 15, 20, 40 ou 80 para 1 e a composição dos reagentes e os tempos e as temperaturas de reação de concentração podem ser variados para ajustar a quantidade de biotina incorporada na reação. Por exemplo, sais e outros agentes podem ser opcionalmente otimizados. Em uma modalidade, o dímero de GDF-8 maduro é biotinilado em associação com a porção pró-peptídica amino terminal de GDF-8 para evitar a inativação do dímero maduro durante a reação de biotinilação. Os derivados de biotina são bem conhecidos e estão disponíveis na técnica. As modificações da biotina incluem braços espaçadores variáveis, modificações para afetar a solubilidade e/ou grupos reativos, por exemplo, para permitir a clivagem do grupamento de biotina. Os ésteres de succinimidila de biotina e seus derivados, incluindo ésteres de sulfossuccinimidila solúveis em água podem ser utilizados para a biotinilação de GDF-8 em resíduos de lisina, por exemplo. Para quantificar a quantidade de biotina incorporada, por exemplo, são utilizadas técnicas analíticas e de medição bem conhecidas, incluindo cromatografia líquida de alta pressão em fase inversa, espectroscopia de massa etc. Adicionalmente, estão disponíveis kits comerciais para a quantificação da biotina através de ensaios colorimétricos ou fluorimétricos, por exemplo (ver, por exemplo, EZ® Biotin Quantitation Kit, Pierce, utilizing HABA (ácido 2-(4'-hidroxiazo benzeno)-benzóico)).

Um exemplo de procedimento de biotinilação, por exemplo, inclui a biotinilação do complexo latente de GDF-8 a uma proporção de 15 ou 20 mols de EZ-link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) para 1 mol do complexo de GDF-8 durante 2 horas a 2-8°C (ver, por exemplo, o Exemplo 3 da Pub. da Patente U.S. Nº 2004/0142382 A1). A reação pode ser terminada através da diminuição do pH utilizando 0,5% de TFA e então o complexo é submetido à cromatografia em uma coluna C4 Jupiter 250 x 4,6 mm (Phenomenex) para separar o GDF-8 maduro do pró-peptídeo de GDF-8. As frações do GDF-8 biotinilado eluídas com um gradiente de TFA/CH3CN são agrupadas, concentradas e quantificadas através do MicroBCA® protein Assay Reagent Kit (Pierce) ou da utilização de outras técnicas de isolamento e de concentração bem

conhecidas.

Em uma modalidade preferida, um ensaio de ligação *in vitro* compreende um agente de captura da proteína GDF-8 biotinilada e a proteína GDF-8 entra em contato com a superfície do recipiente de reação através da interação do grupamento de biotina com avidina na superfície do recipiente de reação. Em algumas modalidades, a proporção molar do grupamento de biotina em relação à proteína GDF-8 madura está entre aproximadamente 0,5:1 e aproximadamente 4:1 na proteína GDF-8 madura biotinilada. Em outras modalidades, a proporção média de biotina em relação ao dímero de GDF-8 é menor que aproximadamente 5 para 1, menor que aproximadamente 2 para 1 ou menor que aproximadamente 1 para 1. A proporção de biotina em relação à proteína GDF-8 madura foi medida como sendo uma mistura de proporções molares de 0 para 3 nas preparações de GDF-8 ativo, com a maior parte das moléculas estando a aproximadamente 1:1. Em algumas modalidades, a preparação de GDF-8 maduro biotinilado inclui menos que aproximadamente 1, 2, 3, 4 ou 5 mols de biotina por mol do dímero de GDF-8 maduro. A proporção média ou mediana de biotina da proteína GDF-8 madura pode ser menor que ou de aproximadamente, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8 ou 9, por exemplo. O modo para a proporção de biotina em relação à proteína GDF-8 madura pode ser menor que ou de aproximadamente 1, 2, 3, 4 ou 5, por exemplo. Outros agenes de detecção e de captura também podem ser marcados por biotinilação. Por exemplo, o MYO-029 biotinilado pode ser biotinilado até uma proporção de pelo menos (ou menor que) 10:1, 20:1 ou superior, por exemplo. Em modalidades preferidas, a proporção molar média de uma preparação de proteína GDF-8 madura biotinilada está entre aproximadamente 1 e 3 mols de biotina para 1 mol de dímero de GDF-8 maduro. Opcionalmente, pode ser utilizado um outro agente de captura.

Em uma modalidade, o MYO-029 biotinilado é um agente de detecção para a detecção de anticorpos for detecting anti-MYO-029 que se ligam ao MYO-029 imobilizado sobre uma superfície de um recipiente de reação, tal como uma placa de 96 poços. De uma maneira similar, ELISAs

para a detecção de anticorpos para folistatina, vários receptores de ligação ao GDF-8, activina ou pró-peptídeo de GDF-8 são abrangidos dentro destes métodos através da substituição destes materiais e suas respectivas versões biotiniladas para MYO-029 e MYO-029 biotinilado. Em adição, qualquer reagente que possa reconhecer e se ligar aos anticorpos formados contra um inibidor de GDF-8, utilizado isoladamente ou em combinação com outros reagentes para gerar um sinal de resposta à dose praticável, pode ser utilizado para detectar anticorpos para inibidores de GDF-8. Estes reagentes poderiam ser utilizados em um formato de ensaio de ligação direta (especialmente para amostras de origem não humana) ou em um formato competitivo (descrito abaixo).

Em modalidades adicionais, o agente de detecção é complexado através da ligação específica a um anticorpo que também está complexado através da ligação específica a um agente modulador de GDF-8 ("formação de ponte"). Este ensaio de formação de ponte é possibilitado pela multivalência do anticorpo do analito. Em certas modalidades, a presença ou a ausência do anticorpo alvo em uma amostra ou de seu conteúdo é avaliada através da medida da atividade de marcação, que depende do agente de marcação utilizado na marcação do agente de detecção.

Em algumas modalidades, uma marcação "direta" pode ser qualquer molécula ligada ou conjugada a um membro de ligação específico que é capaz de produzir espontaneamente um sinal que pode ser detectado sem a adição de reagentes auxiliares. Alguns exemplos incluem um radioisótopo (por exemplo, ^{125}I, ^{3}H, ^{14}C), um metal pesado, um fluoróforo (por exemplo, luciferase, proteína fluorescente verde, isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, 1-N-(2,2,6,6-tetrametil-1-oxil-4-piperidil)-5-N-(aspartato)-2,4-dinitrobenzeno), um corante (por exemplo, ficocianina, ficoeritrina, Texas Red, o-ftalaldeído), moléculas luminescentes, incluindo moléculas quimioluminescentes e bioluminescentes, partículas de ouro coloidal, partículas de prata coloidal, outras partículas de metais coloidais, Európio, partículas de corante de poliestireno, partículas coradas pequenas tais como sols de corantes e partículas de látex coloridas. Muitas tais substân-

cias são bem conhecidas pelos peritos na técnica.

Em certos casos, a marcação pode ser uma enzima tal como, por exemplo, fosfatase alcalina, peroxidase (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre), glicose oxidase ou β-galactosidase. Em várias modalidades, os substratos que serão utilizados com as enzimas específicas são escolhidos para a produção, na presença da enzima correspondente, de uma alteração detectável na coloração, fluorescência ou luminescência. A enzima pode ser conjugada ao agente modulador de GDF-8 por glutaraldeído ou reticulação por aminação redutiva. Como será facilmente reconhecido, entretanto, existe uma ampla variedade de técnicas de conjugação diferentes e estão facilmente disponíveis para o perito na técnica.

Em uma modalidade particular, o agente de detecção biotinilado e/ou marcado com enzima tal como um anticorpo é adicionado ao complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo e é permitido que se ligue. O reagente em excesso é lavado e uma solução contendo um substrato apropriado é então adicionada ao recipiente de reação. O substrato sofre uma reação catalisada por enzima resultando em uma alteração que pode ser medida por espectrofotometria que é indicativa da quantidade de anticorpo presente na amostra.

A peroxidase, quando incubada com substratos solúveis (por exemplo, 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), o-fenileno diamina (OPD), sulfonato de 2,2'-azino-di [3-etil-benztiazolina] (ABTS), fosfato de para nitrofenil, luminol, polifenóis, ésteres de acridina e luciferina), resulta em uma alteração cromogênica ou luminescente no substrato que pode ser detectada por espectroscopia. Tipicamente, após um período de incubação fixo com o substrato, a reação é resfriada rapidamente (por exemplo, por acidificação) e o resultado é quantificado através da medida da densidade óptica (absorbância) ou luminescência. Os resultados de absorbância podem ser comparados com os valores de DO na faixa linear para as reações cromogênicas e ensaios imunológicos luminescentes são medidos em unidades relativas de luz (RLU). Como uma alternativa adicional, qualquer combinação de reagentes que resulta na ligação e na produção de um sinal de resposta à dose prati-

cável pode ser utilizada (por exemplo, agentes marcados radioativamente, reagentes de enzima/substrato ou sistemas de amplificação para detecção utilizando biotina/avidina, por exemplo).

Ainda em outras modalidades, a marcação é biotina, um hapteno ou uma marcação de epitopo (por exemplo, marcação de histidine, marcação de HA (peptídeo da hemaglutinina), proteína de ligação à maltose, Avi-Tag® ou glutationa-S-transferase), que pode ser detectada através da adição de um agente de detecção marcado que interage com a marcação associada com o complexo de agente modulador de GDF-8. Um agente de detecção marcado com biotina ("biotinilado") pode ser detectado através de sua interação com uma enzima avidina, por exemplo, conjugado de avidina-peroxidase de rábano silvestre após a incubação seqüencial com o conjugado de avidina-enzima e um substrato cromogênio ou fluorogênico adequado. Um agente modulador de GDF-8 biotinilado também pode ser detectado com estreptavidina marcada com európio, em modalidades particulares.

Na etapa (d) de certas modalidades, um complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo associado com a superfície do recipiente de reação é detectado através da avaliação qualitativa ou quantitativa do sinal da marcação. Em alguns casos, a marcação é medida diretamente, por exemplo, por fluorescência ou luminescência ou indiretamente, através da adição de um substrato. Em outros, a marcação é medida após a incubação com um reagente adicional. Em modalidades em que a marcação é a biotina, um conjugado de avidina (tal como a peroxidase de rábano silvestre em algumas modalidades preferidas) pode ser adicionado em uma etapa subseqüente. Em uma modalidade particular, o conjugado de avidina pode se ligar ao agente de detecção imobilizado. O conjugado de avidina em excesso é lavado. Um substrato da enzima é então adicionado, resultando em uma alteração que pode ser medida, por exemplo, na coloração, fluorescência ou luminescência. Em algumas modalidades o substrato para a peroxidase do rábano silvestre é 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

O agente de detecção nas etapas (c) e (d) é, em algumas modalidades (por exemplo, a modalidade apresentada na Figura 1), um segundo

agente modulador de GDF-8 marcado. O agente modulador de GDF-8 pode ser um anticorpo, incluindo um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8, um anticorpo que se liga especificamente a um parceiro de ligação de GDF-8, um receptor de GDF-8, uma proteína ActRIIB, uma proteína contendo domínio de folistatina, uma proteína folistatina, um proteína GASP-1, uma proteína GDF-8, um pró-peptídeo de GDF-8, um inibidor não protéico e uma molécula pequena. Em algumas modalidades o agente de detecção é o mesmo agente modulador de GDF-8 que o agente modulador de GDF-8 não marcado primeiramente na superfície do recipiente de reação. Em algumas modalidades preferidas, o agente modulador de GDF-8 é MYO-029.

Em certas modalidades, os métodos da invenção possibilitam a detecção de anticorpos em uma amostra biológica que se liga especificamente com a folistatina, vários receptores de ligação de GDF-8, activina, pró-peptídeo de GDF-8 ou outros agentes moduladores de GDF-8 em amostras biológicas. Em outras modalidades, os métodos possibilitam a detecção de anticorpos para o agente modulador de GDF-8 administrado em uma amostra biológica de um indivíduo.

O agente de detecção nas etapas (c) e (d) é, em algumas modalidades (por exemplo, como apresentado na Figura 2), GDF-8 marcado com um agente de detecção. Em algumas modalidades preferidas o agente de detecção compreende biotina. Os métodos desta invenção incluem ainda a detecção de anticorpos em uma amostra biológica que se ligam especificamente com a folistatina, vários receptores de ligação de GDF-8, activina, pró-peptídeo de GDF-8 ou outros agentes moduladores de GDF-8 em amostras biológicas. Em outras modalidades, este método possibilita a detecção de anticorpos para as proteínas moduladoras de GDF-8 terapêuticas administradas em uma amostra biológica de um indivíduo.

A invenção fornece um método para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo a um primeiro inibidor de GDF-8, o método compreendendo: (a) o contato de um primeiro inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de um segundo inibidor de GDF-8 marcado ao reci-

piente de reação; e (d) a detecção de um complexo do segundo inibidor de GDF-8 marcado/anticorpo associado com a superfície, em que a detecção do complexo marcado indica uma resposta imunológica ao primeiro inibidor de GDF-8. Em algumas modalidades preferidas, o primeiro inibidor de GDF-8 é MYO-029. Em algumas modalidades preferidas, o segundo inibidor de GDF-8 é MYO-029.

Ainda, é fornecido um método para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo a um agente modulador de GDF-8. Em uma modalidade, o método para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo a um primeiro inibidor de GDF-8 compreende: (a) o contato de um inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação; (b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação; (c) a adição de uma proteína GDF-8 marcada ao recipiente de reação; e (d) a comparação da quantidade de proteína GDF-8 marcada associada com a superfície na amostra de teste com a de uma amostra de controle, em que a detecção de um nível menor de complexo marcado indica uma resposta imunológica ao inibidor de GDF-8. Em algumas modalidades preferidas, o primeiro inibidor de GDF-8 é MYO-029.

Ensaio com Gene Repórter

Em certas outras modalidades, o ensaio *in vitro* é um ensaio com gene repórter (RGA) (ver, por exemplo, Thies e outros, Growth Factors 18: 251-259 (2001)). Em certas modalidades, um RGA compreende as etapas de: (a) fornecimento de uma célula hospedeira que compreende uma construção de gene repórter em um recipiente de reação, em que a construção compreende um elemento de controle que responde ao GDF-8 e um gene repórter; (b) adição de uma quantidade da proteína GDF-8 madura ao recipiente suficiente para ativar a expressão do gene repórter; (c) adição de uma quantidade de um agente modulador de GDF-8 ao recipiente da etapa (b) suficiente para modular a ativação de GDF-8 do gene repórter; (d) adição de uma amostra biológica ao recipiente de reação; e (e) detecção da expressão do gene repórter na célula na presença e na ausência da amostra biológica. Em algumas modalidades, o método compreende a etapa adicional de adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a

fluorescência na presença do gene repórter.

Uma célula hospedeira pode ser uma célula eucariótica de um ser humano, mamífero ou outro animal. Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira é uma linhagem de células, tal como uma linhagem de células eucariótica, uma linhagem de células de mamífero ou uma linhagem de células de câncer, incluindo uma linhagem de células de rabdossarcoma. A construção do gene repórter pode ser introduzida de forma transitória ou estável na célula hospedeira através de qualquer meio conhecido na técnica, incluindo transfecção, eletroporação e similares. A construção do gene repórter compreende um elemento de controle que responde ao GDF-8, tais como seqüências promotoras e/ou intensificadoras e um gene repórter (por exemplo, capaz de expressar um agente de detecção tal como uma enzima) em associação operadora com o elemento de controle (ver, por exemplo, a Pub. da Patente U.S. Nº 2003/0138422 e referências descritas na mesma). Em modalidades preferidas, a enzima catalisará a conversão de um substrato, por exemplo, em uma molécula colorimétrica, fluorescente ou luminescente e a quantidade de expressão do gene repórter será avaliada através da medida da conversão do substrato em um produto que pode ser detectado, como descrito anteriormente.

Por exemplo, para demonstrar a atividade de GDF-8, foi desenvolvido um ensaio com gene repórter (RGA) utilizando um vetor repórter p-GL3$(CAGA)_{12}$ que expressa luciferase. A quantidade de proteína GDF-8 adicionada ao ensaio pode ser titulada para otimização. É selecionada uma quantidade de proteína GDF-8 que é suficiente para produzir 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de ativação máxima da construção repórter. A proteína GDF-8 pode ser adicionada a 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500 ou 1.000 ng/mL, por exemplo. Utilizando uma quantidade de proteína GDF-8, o agente modulador de GDF-8 pode ser titulado para preparar uma titulação da modulação da atividade de GDF-8. Por exemplo, um agente modulador de GDF-8 (tal como MYO-029) pode ser testado em concentrações selecionadas de 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500 ou 1.000 ng/mL, por exemplo. Em modalidades

preferidas, a titulação de um agente modulador de GDF-8 abrangerá a faixa linear de inibição no ensaio. Para identificar um anticorpo que inibe uma atividade biológica de um agente modulador de GDF-8, é adicionada à reação uma quantidade de agente que é suficiente para inibir a atividade da proteína GDF-8 em pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%, por exemplo. É selecionada uma quantidade de MYO-029 que fornece pelo menos aproximadamente 50% de inibição da atividade mediada pela proteína GDF-8 e a amostra biológica é titulada na reação. Opcionalmente, é selecionada uma quantidade de MYO-029 que inibe o sinal de GDF-8 em aproximadamente 80%. A amostra biológica pode então ser adicionada em uma ou mais quantidades, para a identificação da capacidade de um anticorpo na amostra de vencer o efeito do agente modulador de GDF-8 no ensaio com gene repórter, por exemplo. Em modalidades preferidas, o agente é pré-incubado com a amostra de teste antes da adição ao ensaio. Para variar as quantidades da amostra biológica que são adicionadas, são utilizadas diluições de aproximadamente 1:4, 1:5, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 e/ou 1:50, por exemplo. Opcionalmente, a amostra biológica pode ser concentrada ou fracionada como descrito anteriormente.

As células são então tratadas com ou sem 10 ng/mL de GDF-8, por exemplo, e com ou sem a amostra biológica de teste em meio 5A de McCoy com glutamina, estreptomicina, penicilina e 1 mg/mL de albumina do soro bovino durante 6 h a 37°C. Em certas modalidades, os controles do agente modulador de GDF-8 são corridos em paralelo utilizando concentrações de 10 pM até 50 µM, aproximadamente. Os exemplos de concentrações incluem 10 pM, 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM e 50 µM de agente modulador de GDF-8. Em modalidades preferidas, a quantidade de agente modulador de GDF-8 na amostra de teste é comparada com uma titulação de controle de quantidades conhecidas do agente e assim quantificada. A luciferase pode ser quantificada nas células tratadas utilizando técnicas bem conhecidas. Alternativamente, pode ser utilizada uma construção repórter que é capaz de responder à modulação de GDF-8, compreendendo opcionalmente um marcador de detecção

sem ser a luciferase.

Embora esta descrição se refira a modalidades preferidas para a detecção de anticorpos capazes de se ligar a um agente modulador de GDF-8 alvo, é reconhecido que anticorpos para uma variedade de substâncias alvo podem ser detectados utilizando os métodos da presente invenção. Similarmente, embora a descrição da presente invenção esteja direcionada para a detecção e/ou para o monitoramento da produção antiglobulina em seres humanos em associação com a administração *in vitro* de produtos para diagnóstico ou terapêuticos, será reconhecido que a metodologia pode ser adaptada para uso em outras aplicações e espécies também.

Exemplos

Exemplo 1: Ensaios para a Detecção de Anticorpos para MYO-029 com MYO-029 biotinilado

Três ensaios podem ser realizados na caracterização de uma resposta imunológica a um agente modulador de GDF-8, tal como MYO-029: ensaios de seleção, titulação e especificidade. O protocolo para a confirmação de um resultado positivo (por exemplo, detecção de uma resposta imunológica a MYO-029) envolve inicialmente todas as amostras no formato de ensaio de seleção. As amostras negativas em relação à seleção, que geram uma DO menor que o ponto de corte, são relatadas como negativas e não são testadas adicionalmente. As amostras positivas em relação à seleção, isto é, amostras que geram uma DO maior que ou igual ao ponto de corte, são subseqüentemente testadas em ensaios de titulação e de especificidade.

Um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) com o anticorpo anti-MYO-029 é um exemplo específico que foi desenvolvido para os ensaios de seleção, titulação e especificidade. Esta modalidade é um ensaio de formação de ponte planejado para detectar anticorpos para a neutralização do anticorpo MYO-029 que modula GDF-8. O procedimento de ELISA com o anticorpo anti-MYO-029 foi realizado para amostras de soro de rato, macaco, camundongo, coelho e humano. Neste ensaio, o MYO-029 é adsorvido nos poços de uma placa para microtitulação. O MYO-029 biotinilado é

co-incubado com amostras diluídas de soro para permitir que quaisquer imunoglobulinas específicas ao agente modulador de GDF-8 façam ponte entre o MYO-029 adsorvido e biotinilado e adicionado ao ensaio. O MYO-029 biotinilado em ponte é detectado por um conjugado de avidina-peroxidase de rábano silvestre (HRP) que produz uma solução colorida nos poços da placa quando o substrato da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) peroxidase é adicionado. A DO de cada poço é diretamente proporcional à quantidade de MYO-029 biotinilado ligado e é determinada por espectrofotometria.

Os controles positivos e negativos são corridos em cada placa para monitorar o desempenho do ensaio. As DOs das amostras são comparadas com a DO do ponto de corte da placa para determinar se anticorpos específicos para MYO-029 estão presentes. A DO do ponto de corte é definida como o dobro da média da DO do controle negativo. Para as amostras de soro humano e de coelho, 1/DO do ponto de corte é definido como 1,2 vez a média de 1/DO do controle negativo (soro normal humano ou normal de coelho, respectivamente, diluído 1:8). As amostras são inicialmente testadas em um formato de seleção em diluições de 1:8 e 1:16. Qualquer amostra que gera uma DO maior ou igual à do ponto de corte é novamente analisada no formato de titulação (amostras diluídas em série 1:2 partindo de 1:8) para a obtenção do título. O título do anticorpo é definido como a diluição recíproca da amostra que gera uma DO igual à DO do ponto de corte. É relatado o log de tal título. Para a identificação de resultados positivos e para confirmar a especificidade dos anticorpos para MYO-029, pode ser realizado um ensaio de especificidade. As amostras que são positivas no formato de titulação são testadas no ELISA em placas que não foram revestidas com MYO-029 (apenas o tampão de revestimento é adicionado aos poços).

As amostras que são positivas no formato de titulação e negativas no formato de especificidade são confirmadas positivas em relação aos anticorpos anti-MYO-029, de acordo com as linhas de guia a seguir: 1) amostras negativas na seleção são relatadas como negativas e não são testadas adicionalmente; 2) amostras positivas na seleção são subseqüente-

mente testadas nos ELISAs de titulação e de especificidade; 3) o resultado final da amostra para uma amostra positiva em relação à titulação depende do resultado da especificidade; 4) as amostras negativas em relação à especificidade são consideradas positivas (ver abaixo) enquanto que as amostras positivas em relação à especificidade podem ser positivas, dependendo da magnitude do resultado de especificidade.

Exemplo 2: Ensaios para a Seleção de Anticorpos para MYO-029 com MYO-029 biotinilado

As amostras biológicas foram inicialmente testadas no formato de ensaio de seleção descrito neste exemplo. Cada poço de uma placa de ELISA para microtitulação de 96 poços (alta ligação, Costar) foi revestida com 100 µL por poço de solução de revestimento (0,5 µg/mL de MYO-029 em 100 mM de tampão bicarbonato, pH 9,6) no dia anterior à análise das amostras. A placa foi coberta com filme selante e incubada a 2-8°C durante a noite (16-20 horas). No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem THST (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 1,0 mM de glicina, 0,5 M de NaCl e 0,05% (v/v) de Tween 20®) utilizando uma lavadora automática de placas.

O tampão de bloqueio (PBS de Dulbecco + 4% (p/v) de leite em pó desnatado; 200 µL por poço) foi então adicionado e a placa foi coberta com o filme selante e incubada à temperatura ambiente durante 1,5-3,0 horas. A placa foi então lavada quatro vezes com tampão de lavagem (300 µL/poço), revertendo a placa após a segunda lavagem. A placa lavada foi então utilizada imediatamente no ensaio ou selada e armazenada a 2-8°C durante até quatro dias, em que o dia 1 é definido como o dia do bloqueio.

As amostras de soro humano foram descongeladas à temperatura ambiente e misturadas vigorosamente. Foram feitas diluições iniciais de 1:25 em PBST (PBS de Dulbecco + 0,05% (p/v) de Tween 20®) e uma diluição subseqüente 1:3 em PBST + 4% (v/v) de soro humano normal. As soluções de amostra (50 µL/poço) foram transferidas para os poços da placa em duplicata. O MYO-029 biotinilado (ver o Exemplo 12) foi adicionado em cada um dos poços da placa (50 µL/poço). (Os controles positivos e negativos são

descritos adicionalmente no exemplo a seguir.) As placas foram cobertas com filme selante de placa e incubadas em um agitador de placas durante 2 horas ± 10 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas quatro vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem, revertendo a placa após a segunda lavagem.

Avidin D-HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluída em PBST até uma diluição final de 1:50.000 (100 µL/poço) foi então adicionada em cada um dos poços da placa. As placas foram cobertas e incubadas em um agitador de placas à temperatura ambiente durante 1 hora ± 10 minutos. As placas foram então lavadas seis vezes com tampão de lavagem (300 µL/poço), revertendo a placa após a terceira lavagem.

Uma solução do substrato da peroxidase de rábano silvestre TMB (BioFX Laboratories (Randallstown, MD)), à temperatura ambiente, foi então adicionada em cada poço da placa (100 µL/poço). A placa foi incubada na escuridão à temperatura ambiente durante aproximadamente 12 ± 1 minutos antes da reação ser resfriada rapidamente através da adição de ácido sulfúrico a 0,18 M (100 µL/poço) em cada um dos poços da placa na mesma ordem que a da adição do substrato.

As DOs das amostras em um comprimento de onda de 450 nm foram comparadas à DO da placa no ponto de corte para determinar se os anticorpos específicos para MYO-029 estavam presentes. A DO do ponto de corte é definida como 1,5 vez a média do controle negativo que é o soro humano normal diluído 1:25. A absorbância a 450 nm foi medida com uma leitora de placas Molecular Devices Spectra Max 250 dentro de um período de 30 minutos após o resfriamento rápido da reação.

Para o ensaio, a DO média do controle negativo é <0,150. O título médio do controle positivo é determinado com base no valor da DO no ponto de corte da placa (o ponto de corte é definido como 1,5x a média da DO do controle negativo) utilizando a equação no Exemplo 7.

As amostras negativas em relação à seleção, que geram uma DO menor que a do ponto de corte, são relatadas como negativas, com um título log < 1,40 e não são testadas adicionalmente. As amostras positivas

em relação à seleção (amostras que geram uma DO maior que ou igual a dp ponto de corte), são subseqüentemente testadas nos ensaios de titulação e de especificidade.

Exemplo 3: Controles

Controle Negativo

Considerações Gerais – O soro humano normal agrupado (por exemplo, da Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY)) foi utilizado como um controle negativo. As soluções de controle negativo foram preparadas no dia do experimento através da diluição à temperatura ambiente do soro diluído 1:25 com PBST.

Variabilidade Intraensaio – A variabilidade intraensaio (CV) para os valores de DO e de ponto de corte da solução de controle negativo foi determinada através da análise dos 16 poços em réplica em cada placa. Foram avaliados três dias de teste. Os dados obtidos para cada placa foram analisados independentemente para gerar resultados de precisão intraensaio. A média dos valores de ponto de corte obtidos dos dias 1, 2 e 3 é de 0,087, 0,077 e 0,072, respectivamente. Os valores de CV correspondentes são 18,7, 6,4 e 3,7%. As CVs dos valores ed DO de controle negativo (16 réplicas por placa) variavam entre 2,2% e 13,3%.

Variabilidade Interensaio – Foi determinada a variabilidade interensaio (CV) para os valores de DO e de ponto de corte da solução de controle negativo. A DO média do ponto de corte e o valor de CV correspondente foram observados como sendo de 0,089 e 25,0%, respectivamente. A DO média e o valor de CV correspondente para o controle negativo foram observados como sendo de 0,060 e 25,0%, respectivamente. O valor de CV para as 16 réplicas da DO do controle negativo em cada placa variava entre 2,2% e 13,3%.

Controle Positivo

Considerações Gerais – O anticorpo anti-IgG humana de cabra purificado por afinidade (KPL, Gaithesburg, MD) foi utilizado como um controle positivo para o ensaio de ELISA de formação de pontes de MYO-029. As soluções estoque de controle positivo foram preparadas no dia do expe-

rimento através da reidratação de 1 mg de anti-IgG humana de cabra em uma mistura de 0,5 mL de água purificada e 0,5 mL de glicerol. A solução estoque foi diluída até 500 ng/mL em PBS + 0,1% de BSA ou 500 ng/mL em PBS + 0,1% de BSA.

Linearidade da Diluição – Os testes de linearidade da diluição foram realizados para a solução de controle positivo. Cinco soluções de teste foram preparadas com diluições de partida iniciais do controle positivo de 1:25, 1:75, 1:225, 1:675 e 1:2025. Os resultados demonstraram que a CV entre todos os valores de titulação que poderiam ser calculados para as cinco titulações do controle positivo estadas era de 1,6%. Não foi detectada uma tendência em direção à não linearidade no teste.

Variabilidade Intraensaio – A variabilidade intraensaio foi determinada para os valores de DO e de titulação das soluções de controle positivo. O controle positivo foi testado várias vezes na mesma placa (intraensaio). Cada placa continha 5 titulações individuais do controle positivo. O teste foi realizado utilizando um total de 4 placas no dia 1, 2 placas no dia 2 e 4 placas no dia 3. A variabilidade intraensaio foi avaliada em três dias separados. Os dados obtidos para cada placa foram analisados independentemente com a finalidade de gerar resultados de precisão intraensaio.

A variabilidade entre placas dos valores máximos de DO e de titulação para o controle positivo foi determinada empregando os dados obtidos de todas as placas testadas por dia. As CVs intraensaio (intra-placa) obtidas para os títulos log estavam dentro de 2,2%. Os valores de CV obtidos utilizando títulos de log do controle positivo individual em relação a todas as placas testadas para os dias 1, 2 e 3 são de 12,4, 1,7 e 1,5%, respectivamente. Os valores de CV obtidos para a DO máxima gerada pelo controle positivo em relação a todas as placas para os dias 1, 2 e 3 são de 18,9, 2,8 e 3,2%, respectivamente.

O SD médio e a CV dos valores de DO em cada diluição do controle positivo em relação a 4 placas foram analisados para o dia 3 da avaliação intraensaio. Os valores de CV variavam entre 2,8% e 4,7%. Foi realizado um perfil de titulação do controle positivo. Não havia evidência de um e-

feito pró-zona.

Variabilidade Interensaio – Para determinar a variabilidade interensaio aleatória dos valores e dos títulos da DO do controle positivo, as soluções de controle foram analisadas em 20 placas ao longo de 6 dias. Para cada placa, foi utilizado um conjunto de duplicatas dos controles positivos (mesma posição em cada placa) durante a análise final. Para a solução de controle positivo, os valores do título médio log e da CV média log eram de 3,37 e 6,6%, respectivamente. Os valores de DO máxima e de CV da DO máxima eram de 2,137 e 11,9%, respectivamente.

Formulação – A solução estoque de trabalho de controle positivo (500 ng/mL) foi inicialmente preparada em água deionizada com 0,1% de BSA para avaliação. Todas as corridas de validação foram realizadas utilizando o estoque de trabalho preparado em água deionizada + 0,1 % de BSA. A solução estoque de trabalho de controle positivo foi então subseqüentemente preparada em PBS com 0,1% de BSA uma vez que o PBS era o diluente desejado. Foi realizada uma comparação do título log e a DO máxima de ambas as soluções através da análise do controle positivo preparado partindo de duas soluções estoque diferentes na mesma corrida de placa. Não foi observada diferença significativa nos títulos log para o controle positivo (dados não mostrados). A diferença na DO máxima e o título numérico podem ser considerados dentro da variabilidade do ensaio. A solução estoque de trabalho será preparada no PBS + 0,1 % de BSA e armazenada a -70°C durante até 1 ano.

Exemplo 4: Reactividade na População Não Exposta

Utilizando o procedimento do Exemplo 1, vinte e cinco amostras individuais de soro normal foram testadas três vezes ao longo de 3 dias (n=75 resultados) para analisar a distribuição estatística das DOs e determinar um valor de ponto de corte do ensaio com base estatística.

O valor médio das DOs da amostra para as 25 amostras analisadas ao longo de 3 dias era de 0,058, que é idêntico aquele para o valor médio de DO para os controles negativos analisados nas mesmas placas. Isto indica que o desempenho do controle negativo é representativo do de-

sempenho da amostra individual normal e pode ser utilizado para normalizar as DOs do ponto de corte entre placas. Portanto, o ponto de corte para uma placa individual pode ser calculado através da multiplicação da DO média do controle negativo de placa por um fator de multiplicação n que foi derivado com base nos 95 percentuais estimados para as 25 amostras normais.

A estimativa não paramétrica dos 95 percentuais foi feita através da análise da coleção gerada dos valores de DO e da determinação de uma DO alta o suficiente para incluir 95% dos valores (0,081). A proporção dos 95 percentuais em relação às amostras e à DO de controle negativo era de 1,39. Uma vez que esta avaliação foi realizada utilizando um conjunto limitado de amostras em relação a um período de tempo curto (3 dias consecutivos), é esperado que a variabilidade no desempenho de amostras de estudos clínicos, coletadas de vários locais e analisadas ao longo de um período de tempo mais longo seja mais ampla. Levando a variabilidade esperada maior das amostras do estudo em consideração e para conveniência, o fator de multiplicação n que será utilizado para o cálculo do valor de ponto de corte da placa foi arredondado de 1,39 para 1,5.

Exemplo 5: Sensibilidade do Ensaio

O anti-IgG humano de cabra purificado por afinidade foi utilizado para preparar a solução de controle positivo. Conseqüentemente, a sensibilidade do ensaio foi calculada com base na concentração inicial do reagente de controle positivo e seu título numérico. No ensaio, a concentração de partida do reagente de controle positivo era de 500 ng/mL. O valor médio do título obtido durante a avaliação feita anteriormente para a solução de controle positivo preparada em PBS + 0,1% de BSA era de 4680. A sensibilidade do ensaio foi determinada como sendo de 107 pg/mL (500 ng/mL/4680) utilizando a equação a seguir:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Concentração de partida da solução de controle positivo}}{\text{Título numérico do controle positivo}}$$

Exemplo 6: Teste de Interferência do Fármaco

A solução de controle positivo (1:25) foi salpicada com várias quantidades de MYO-029 para fornecer uma concentração final do fármaco

a 0,01, 0,1, 1,0 e 10 µg/mL antes das diluições de 3 vezes subseqüentes em PBST (1:75, 1:225, 1:675, 1:2025, 1:6075, 1:18225 e 1:54675). Os títulos e as DOs máximas são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2

Condição do Ensaio	Título Log	Título Log % de Diferença	DO Máx.	DO Máx. % de Diferença
Sem salpicar	3,12		2,460	
Salpicada a 0,01 µg/mL MYO-029	2,83	-9,3	1,194	-51,5
Salpicada a 0,1 µg/mL MYO-029	2,16	-30,8	0,189	-92,3
Salpicada a 0,1 µg/mL MYO-029	<1,40	NA	0,079	-96,8
Salpicada a 10 µg/mL MYO-029	<1,40	NA	0,061	-97,5

Os resultados mostraram que o desempenho do controle positivo foi significativamente afetado a 0,1 µg/mL e concentrações maiores de MYO-029 na amostra. Foi observada uma queda na DO máxima para a concentração de 0,01 µg/mL de MYO-029. Devido à heterogeneidade da resposta de anticorpo, a interferência de MYO-029 observada nas amostras pode ser diferente da interferência detectada para o controle positivo.

Exemplo 7: Ensaios de Titulação

As amostras são testadas inicialmente em um formato de seleção em diluições de 1:25 e 1:75. Qualquer amostra que gera uma DO maior que ou igual a do ponto de corte é analisada novamente nos ensaios de titulação e de especificidade (junto com a amostra pré-dose correspondente, se a amostra que gera uma DO maior que ou igual à do ponto de corte for uma amostra pós-dose). Os ensaios de titulação e de especificidade para a amostra podem ser realizados simultaneamente ou seqüencialmente. Para a obtenção do título do anticorpo, as amostras são primeiramente diluídas 1:25 e então diluídas em série 1:3 com PBST + 4% soro humano de 1:25 para a obtenção de diluições até 1:54.675. Cada amostra é analisada em duplicata. O ensaio é realizado essencialmente como descrito no Exemplo 2.

O título de uma certa amostra é definido como a diluição recíproca da amostra que geraria um valor de DO igual à do ponto de corte. Os valores numéricos do título são calculados por interpolação utilizando a E-

quação 1 abaixo, em que DOcp é a DO do ponto de corte, OD1 é o valor de DO da amostra acima da DO do ponto de corte na série de diluição, OD2 é o valor de DO da amostra abaixo da DO do ponto de corte na série de diluição, DilnOD1 é a diluição recíproca da amostra em OD1 e DilnOD2 é a diluição recíproca da amostra em OD2.

$$[\text{Título}] = \left[\text{DilnOD1} \left(\left(\frac{\text{OD1} - \text{ODcp}}{\text{OD1} - \text{OD2}} \right) * (\text{DilnOD1} - \text{DilnOD2}) \right) \right]$$

O valor logarítmico do título numérico é relatado como o resultado final.

$$[\log \text{Título}] = \log \left[\text{DilnOD1} \left\{ \left(\frac{\text{OD1} - \text{ODcp}}{\text{OD1} - \text{OD2}} \right) * (\text{DilnOD1} - \text{DilnOD2}) \right\} \right]$$

Por exemplo, na análise de uma amostra de soro de rato mostrada na Tabela 3 abaixo, ODcp = 0,252, Diln OD1 = 675 e Diln OD2 = 2025 e o log do título da amostra desconhecida é 3,29. Os dados brutos foram analisados utilizando o sistema Watson LIMS.

Tabela 3

Controle positivo (PC)		PC Médio	Controle Negativo (NC)		NC Médio	Amostra desconhecida		Média da amostra desconhecida
2,927	2,882	2,928	0,121	0,122	0,126	1,684	1,678	1,681
1,402	1,400	1,401	0,129	0,129		1,665	1,678	1,672
0,610	0,676	0,643	0,129	0,132		1,150	1,149	1,150
0,330	0,334	0,332	0,120	0,130		0,440	0,506	0,473
0,209	0,197	0,203	0,116	0,128		0,258	0,216	0,237
0,164	0,197	0,181	0,125	0,119		0,187	0,148	0,168
0,151	0,146	0,148	0,126	0,120		0,144	0,121	0,132
0,140	0,153	0,147	0,131	0,141		0,139	0,133	0,136

Exemplo 8: Ensaio de Especificidade

As amostras foram testadas inicialmente em um formato de seleção em diluições de 1:25 e 1:75. Foram testadas as amostras positivas. Para confirmar a especificidade dos anticorpos para MYO-029, as amostras que são positivas no formato de seleção ou de titulação são testadas em

placas que não foram revestidas com MYO-029 (é adicionado apenas o tampão de revestimento aos poços).

As amostras são diluídas em série 1:3 com PBST + 4% de soro humano partindo de 1:25 para obter diluições até 1:54.675. Cada amostra é analisada em duplicata. O ensaio é realizado como descrito no Exemplo 1. Cada poço de uma placa de ELISA para microtitulação de 96 poços (Costar) foi revestido com 100 µL por poço de tampão de revestimento (100 mM de tampão bicarbonato, pH 9,6) no dia anterior à análise das amostras. A placa foi coberta com filme selante e incubada a 2-8°C durante a noite (16-20 horas). No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem utilizando uma lavadora automática de placas.

O tampão de bloqueio (PBS de Dulbecco + 4% (p/v) de leite em pó desengordurado; 200 µL por poço) foi então adicionado e a placa foi coberta com filme selante e incubada à temperatura ambiente durante 1,5-3,0 horas. A placa foi então lavada quatro vezes com tampão de lavagem (300 µL/poço), revertendo a placa após a segunda lavagem. A placa lavada foi então utilizada imediatamente no ensaio ou selada e armazenada a 2-8°C durante até quatro dias, em que o dia 1 é definido como o dia do bloqueio.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e misturadas vigorosamente. Foram feitas diluições iniciais de 1:25 em PBST (PBS de Dulbecco + 0,05% (p/v) de Tween 20) e uma diluição subseqüente de 1:3 em PBST + 4% (v/v) de soro humano normal. O MYO-029 biotinilado foi adicionado em cada um dos poços da placa (50 µL/poço) em duplicata. (Os controles positivos e negativos são descritos adicionalmente no exemplo a seguir.) As soluções de amostra (50 µL/poço) foram transferidas para os poços da placa em duplicata. As placas foram coberdas com filme selante de placa e incubadas no agitador de placas durante 2 horas ± 10 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas quatro vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem, revertendo a placa após a segunda lavagem.

A solução de Avidin D-HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (100 µL/poço) foi então adicionada em cada um dos poços da placa. As

placas foram cobertas e incubadas em um agitador de placas à temperatura ambiente durante 1 hora ± 10 minutos. As placas foram então lavadas seis vezes com tampão de lavagem (300 µL/poço), revertendo a placa após a terceira lavagem.

Uma solução de substrato da peroxidase de rábano silvestre 3,3',5,S'-tetrametilbenzidina (substrato TMB; BioFX Laboratories (Randallstown, MD)), à temperatura ambiente, foi então adicionada em cada poço da placa (100 µL/poço). A placa foi incubada na escuridão à temperatura ambiente durante aproximadamente 12 ± 1 minuto antes da reação ser resfriada rapidamente através da adição de 0,18 M de ácido sulfúrico (100 µL/poço) em cada um dos poços da placa na mesma ordem que a da adição do substrato.

As DOs das amostras são comparadas com a DO do ponto de corte da placa para determinar se o sinal proveniente do ensaio de titulação detacta anticorpos específicos para MYO-029. A DO do ponto de corte é definida como 1,5 vez a média do controle negativo. A absorbância a 450 nm foi medida dentro de 30 minutos após o resfriamento rápido da reação.

O resultado da amostra final para uma amostra positiva em relação à titulação depende do resultado da especificidade (por exemplo, as amostras negativas em relação à especificidade são consideradas positivas). As amostras que são positivas no formato de titulação e negativas no formato de especificidade são confirmadas positivas para anticorpos anti-MYO-029. As amostras positivas em relação à especificidade podem ou não ser consideradas positivas, dependendo da magnitude do resultado da especificidade.

Exemplo 9: Avaliação das Amostras

Os resultados dos ensaios de titulação e de especificidade são avaliados com base na tabela a seguir. Nos casos em que uma repetição do ensaio de titulação produzir um resultado que é incongruente com o resultado original, o parâmetro pré-estabelecido é o resultado original.

Tabela 4. Avaliação das Amostras

Resultado da Seleção (Título Log)	Resultado da Titulação (Título Log)	Repetir o ensaio de titulação (Título Log)	Especificidade Correspondente Resultado da Placa (Título Log)	Resultado Relatado (Título Log)
<1,40	NA	NA	NA	Negativo (<1,40)
≥ 1,40 e ≤ 1,88	<1,40	NA	NA	Negativo (<1,40)
	≥ 1,40 e < 0,48 acima de ScR	NA	< 1,40	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e TR ≥ 0,48 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e TR < 0,48 acima SR	Negativo (< 1,40)
	≥ 1,40 e ≥ 0,48 acima de ScR	< 1,40	< 1,40	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e TR ≥ 0,48 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e TR < 0,48 acima SR	Negativo (< 1,40)
	Analisar Novamente o Resultado	≥ 1,40	< 1,40	Positivo (R-TR)
			≥ 1,40 e RTR ≥ 0,48 acima SR	Positivo (R-TR)
			≥ 1,40 e RTR < 0,48 acima SR	Negativo (<1,40)
> 1,88	< 1,40	< 1,40	NA	Negativo (<1,40)
	Analisar Novamente o Resultado	≥ 1,40	< 1,40	Positivo (R-TR)
			≥ 1,40 e RTR ≥ 0,48 acima SR	Positivo (R-TR)
			≥ 1,40 e RTR < 0,48 acima SR	Negativo (<1,40)
	≥ 1,40	NA	< 1,40	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e RTR ≥ 0,48 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 1,40 e RTR < 0,48 acima SR	Negativo (<1,40)

NA = Não aplicável. ScR = Resultado da seleção. TR = Resultado da titulação. RTR = Resultado do título do novo ensaio. SR = resultado do ensaio de especificidade.

A determinação do fato de um anticorpo para MYO-029 ter ocorrido no indivíduo é feita com base na comparação dos resultados de amostras pré- e pós-dose. Se as amostras pré-doses forem negativas e as amostras pós-dose correspondentes forem positivas, o indivíduo é considerado como sendo positivo em relação a uma resposta imunológica. Se as amostras tanto de pré-dose quanto de pós-dose tiverem teste positivo, o indivíduo é chamado de positivo em relação a uma resposta imunológica quando o valor de titulação da amostra pós-dose for pelo menos um fator de diluição (3 vezes) maior que o valor do título determinado para a amostra pré-dose correspondente.

Exemplo 10: Detecção de Anticorpos para MYO-029 com GDF-8 Biotinilado

Para detectar os anticorpos que inibem a ligação do GDF-8 biotinilado ao MYO-029, cada poço de uma placa de ELISA para microtitulação de 96 poços (Costar) foi revestido com 100 µL por poço de solução de revestimento (6 µg/mL de MYO-029 em 100 mM de tampão bicarbonato, pH 9,6) no dia anterior à análise das amostras. Alternativamente, foi utilizado 0,5 µg/mL de MYO-029. A placa foi coberta com filme selante e incubada a 2-8°C durante a noite (16-22 horas). No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem utilizando uma lavadora automática de placas.

O tampão de bloqueio (PBS de Dulbecco + 1 % (p/v) de albumina do soro bovino; 250 µL por poço) foi então adicionado e a placa foi coberta com filme selante e incubada à temperatura ambiente durante 1,5-3,0 horas. A placa foi então lavada quatro vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem THST (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 1,0 mM de glicina, 0,5 M de NaCl e 0,05% (v/v) de Tween 20®), revertendo a placa após a segunda lavagem. A placa lavada foi então utilizada imediatamente no ensaio ou selada e armazenada a 2-8°C durante até quatro dias, em que o dia 1 é definido como o dia do bloqueio.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e misturadas vigorosamente. Foram feitas diluições iniciais de 1:8 em THST e uma diluição subseqüente de 1:2 em THST. As soluções de amostra (100

µL/poço) foram transferidas para os poços da placa em duplicata. Alternativamente, foram feitas diluições iniciais da amostra de 1:25 em PBST (PBS de Dulbecco 0,05% p/v de Tween 20) seguidas por uma diluição de 1:3, transferindo 50 µL/poço.

Uma solução estoque de controle positivo (anti-soro anti-MYO-029 de coelho, salpicada no soro humano normal na diluição de 1:6,25) foi descongelada e diluída 1:8 em THST. Foram feitas subseqüentemente diluições em série de duas vezes em THST contendo 12,5% de soro humano normal agrupado, fornecendo o conjunto de diluições de controle positivo a seguir: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. As soluções de controle positivo (100 µL/poço) foram transferidas para os poços da placa em duplicata. As placas foram cobertas com filme selante e incubadas no agitador de placas durante 2 horas ± 10 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas quatro vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem THST, revertendo a placa após a segunda lavagem.

O GDF-8 biotinilado (ver o Exemplo 12) foi então adicionado em cada um dos poços da placa (100 µL/poço de uma solução a 35 ng/mL). As placas foram cobertas com filme selante de placas e incubadas no agitador de placas durante 1,5 hora ± 10 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas quatro vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem, revertendo a placa após a segunda lavagem.

A solução de Avidin-HRP (Pierce, Rockford, IL) (100 µL/poço) foi então adicionada em cada um dos poços da placa. Foi alternativamente utilizada a Avidin D-HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As placas foram cobertas e incubadas em um agitador de placas à temperatura ambiente durante 40 minutos ou uma hora. As placas foram então lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (300 µL/poço), revertendo a placa após a segunda lavagem.

[0146] Uma solução de substrato da peroxidase 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (substrato TMB; BioFX Laboratories, Randallstown, MD), à temperatura ambiente, foi então adicionada em cada poço da placa (100 µL/poço). A placa foi incubada na escuridão à temperatura ambiente durante aproximadamente

10 minutos antes da reação ser resfriada rapidamente através da adição de 0,18 M de ácido sulfúrico (100 µL/poço) em cada um dos poços da placa na mesma ordem que a da adição do substrato. A densidade óptica foi lida a 450 nm em um espectrofotômetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) dentro de 30 minutos do resfriamento rápido e as DOs foram transformadas em 1/DO para análise.

Exemplo 11: Determinação do Título e Análise dos Dados

Para as amostras com teste positivo no ensaio de seleção anterior (Exemplo 10), o título foi determinado através da diluição das amostras de teste 1:2 em THST seguida por sete diluições em série subseqüentes 1:8 em THST contendo 12,5% de soro humano normal agrupado, fornecendo diluições finais de 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024. O título de uma certa amostra é definido como a diluição recíproca da amostra que geraria um valor de 1/DO igual ao do ponto de corte. O ponto de corte do ensaio é definido como 1,2 vez o valor médio de 1/DO do controle negativo; e se baseia nos 95 por cento dos valores de 1/DO observados em um conjunto de amostras de soro de indivíduos humanos normais. Os valores numéricos do título são calculados por interpolação utilizando a equação abaixo, em que DOcp é a DO do ponto de corte, OD1 é o valor de DO da amostra acima da DO do ponto de corte na série de diluição, DO2 é o valor de DO da amostra abaixo da DO do ponto de corte na série de diluição, DilnOD1 é a diluição recíproca da amostra em OD1 e DilnOD2 é a diluição recíproca da amostra em OD2.

$$[\text{Título}] = \left[\text{Diln1/OD1} - \left(\left(\frac{\text{1/OD1} - \text{1/ODcP}}{1/OD1 - 1/0D2} \right) * (Di\ln 1/OD1 - Di\ln 1/OD2 \right) \right]$$

Os resultados dos ensaios de titulação e de especificidade foram avaliados utilizando a tabela a seguir. Nos casos em que uma repetição do ensaio de titulação produz um resultado que é incongruente com o resultado original, o parâmetro pré-estabelecido é o resultado original.

Tabela 5

Resultado da Seleção (Título Log)	Resultado da Titulação (Título Log)	Repetir o ensaio de titulação (Título Log)	Especificidade Correspondente Resultado da Placa (Título Log)	Resultado Relatado (Título Log)
<0,903	NA	NA	NA	Negativo (<0,903)
≥ 0,903 e ≤ 1,50	<0,903	NA	NA	Negativo (<0,903)
	≥ 0,903 e < 0,60 acima de ScR	NA	< 0,903	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR ≥ 0,60 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR < 0,60 acima SR	Negativo (< 0,903)
	≥ 0,903 e ≥ 0,60 acima de ScR	< 0,903	< 0,903	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR ≥ 0,60 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR < 0,60 acima SR	Negativo (< 0,903)
	Analisar Novamente o Resultado	≥ 0,903	< 0,903	Positivo (R-TR)
			≥ 1,50 e RTR ≥ 0,60 acima SR	Positivo (R-TR)
			≥ 1,50 e RTR < 0,60 acima SR	Negativo (<0,903)
> 1,50	< 0,903	< 0,903	NA	Negativo (<0,903)
	Analisar Novamente o Resultado	≥ 0,903	< 1,40	Positivo (R-TR)
			≥ 0,903 e RTR ≥ 0,60 acima SR	Positivo (R-TR)
			≥ 0,903 e RTR < 0,60 acima SR	Negativo (<0,903)
	≥ 0,903	NA	< 0,903	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR ≥ 0,60 acima SR	Positivo (TR)
			≥ 0,903 e TR < 0,60 acima SR	Negativo (<0,903)

NA = Não aplicável. ScR = Resultado da seleção. TR = Resultado da titulação. RTR = Resultado do título do novo ensaio. SR = resultado do ensaio de especificidade.

Exemplo 12: Biotinilação

O GDF-8 foi biotinilado como a seguir. O GDF-8 de comprimento completo foi expresso em um processo de biorreator de cultura de células CHO em batelada alimentada, fornecendo a forma do complexo latente de GDF-8. O coletado da cultura de células foi clarificado utilizando filtração microporosa de fluxo normal e então concentrado e diafiltrado utilizando ultrafiltração de fluxo tangencial. Este agrupamento do retentato foi então carregado na cromatografia por afinidade por metal imobilizada com Ni^{2+}-NTA (IMAC) onde o complexo de GDF-8 é capturado. A eluição ocorreu com um gradiente linear de 50 mM de Na_2HPO_4, 300 mM de NaCl, 20-500 mM de imidazol ao longo de 5 volumes de coluna. O pico resultante sofreu então troca de tampão através de diálise para permitir a remoção do imidazol derivado da IMAC e para colocar um tampão apropriado no lugar para a reação de biotinilação.

A preparação do complexo latente foi então biotinilada. Uma proporção molar de sulfo-NHS-LC-biotina alvo em relação ao complexo de GDF-8 de 14:1 foi utilizada na reação. As proporções de reagente em relação ao substrato de 10:1, 15:1 e 20:1 foram também testadas, por exemplo. O reagente sólido de biotina (EZ-link Sulfo-NHS-Biotin, Pierce Biotechnology) foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) a 200 g/L antes de ser adicionado à amostra do complexo de GDF-8. A reação foi realizada com uma concentração do complexo de GDF-8 menor que 1,5 g/L em 100 mM de Na_2HPO_4, 150 mM de NaCl, pH 7,2, a 4°C, durante 120 minutos. A mistura de reação foi misturada suavemente no início da reação e protegida da luz durante o curso da reação. A reação foi interrompida através da adição de 0,5% (v/v) de etanol amina ou 5,0% (v/v) de 1 M de Tris.

Este complexo de GDF-8 biotinilado sofreu então troca de tampão através de diálise em um tampão de alta concentração de caotropo com baixo pH (6000 mM de uréia, 300 mM de NaCl, 50 mM de H_3PO_4, pH = 2,5). A dissociação do complexo ocorre com protonação em pH baixo. Neste tampão, o complexo se dissocia e se solubiliza em pró-peptídeos e dímeros maduros. Ainda, a biotina livre é removida durante a diálise. Este agrupamento

do retentato foi então carregado na cromatografia por exclusão de tamanho de alto desempenho em que a forma de dímero maduro do GDF-8 é separado dos pró-peptídeos e do monômero residual.

Esta fração compreendendo a forma de dímero maduro biotinilado de GDF-8 foi então adicionalmente processada em cromatografia em fase inversa de alto desempenho com butila utilizando um gradiente linear de 0-90% (v/v) de CH_3CN, 0,1% (v/v) de CF_3CO_2H, pH = 2,0 ao longo de 5 volumes de coluna. O pico desta etapa sofreu troca de tampão através de diálise em um tampão de formulação de baixo pH (0,1% (v/v) de CF_3CO_2H, pH = 2,0).

O dímero de GDF-8 maduro biotinilado foi avaliado em relação à retenção da função, por exemplo, sua atividade na ligação e ensaios com gene repórter. A proteína GDF-8 madura biotinilada foi medida por cromatografia líquida de alto desempenho em fase inversa/espectrometria de massa com tempo de vôo quádruplo com ionização por eletrospray (RP-HPLC/ESI-QTOF-MS) e a preparação contém uma mistura de proporções molares de aproximadamente 0-3, com a maior parte das moléculas estando a 1:1. As proporções molares alvo maiores forneceram medidas tão altas quanto 9:1, através do ajuste de condições bem conhecidas na técnica.

O MYO-029 é biotinilado utilizando um ensaio similar e pode ser utilizado nos métodos descritos aqui. Essencialmente, o MYO-029 isolado é diluído, sofre troca de tampão e é então biotinilado. As condições de reação e de armazenamento são as mesmas para GDF-8, exceto para alguns parâmetros. O valor da concentração de MYO-029 varia de 10-24 g/L. Uma proporção molar de sulfo-NHS-LC-biotina alvo em relação ao MYO-029 na reação de biotinilação é de 40:1, que produz uma proporção molar medida de 8-11. Esta é medida através de um ensaio de espectrometria a A_{600} nm com avidina:HABA (ImmunoPure Avidin and HABA, Pierce). Utilizando diálise, este reagente sofre então troca de tampão para um tampão de formulação com pH neutro e baixo teor de sal (137 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4, 3 mM de KH_2PO_4, pH = 7,2).

Exemplo 13: Ensaio com Gene Repórter

Um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8 é detectado em um ensaio com gene repórter com base em células (RGA) para a atividade biológica de GDF-8. Os anticorpos que inibem a atividade de um agente modulador de GDF-8, tais como os anticorpos que neutralizam a atividade de MYO-029, são detectados pelo ensaio a seguir.

Foi utilizada a linhagem de células de rabdomiossarcoma humano A204pCAGA, em que A204 (ATCC HTB-82) foi transfectado de forma estável com uma construção de gene repórter, pGL3(CAGA)$_{12}$ (descrita nas Publ. das Patentes U.S. N^{os} 2003/0138422 A1 e 2004/0142382 A1) utilizando técnicas bem conhecidas. Alternativamente, as células A204 são transfectadas transitoriamente com pGL3(CAGA)$_{12}$ utilizando o reagente de transfecção FuGENE.TM.6 (Boehringer Manheim, Alemanha). Após a transfecção, as células foram cultivadas em placas de 96 poços em meio 5A de McCoy suplementado com 2 mM de glutamina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de penicilina e 10% de soro fetal de bezerro durante 16 horas. As células foram tratadas com ou sem uma quantidade constante (75 ng/mL) da proteína GDF-8 madura, uma quantidade constante de (400 ng/mL) MYO-029 e uma série de diluições de controle positivo em meio 5A de McCoy com glutamina, estreptomicina, penicilina e 10% de soro fetal de bezerro durante 6 horas a 37°C para os controles. Opcionalmente, é selecionada uma quantidade de GDF-8 que fornece aproximadamente 80% do sinal máximo da luciferase. O MYO-029 é pré-incubado com o GDF-8 em concentrações de 6,25 ng/mL até 400 ng/mL (5,9 nM até 375 nM) durante 1 hora à temperatura ambiente e então as proteínas são adicionadas no RGA. Os anticorpos de controle positivo para o agente modulador de GDF-8 foram incubados com MYO-029 e analisados no RGA. Opcionalmente, é selecionada uma quantidade de MYO-029 que inibe o sinal de GDF-8 em aproximadamente 80%. A luciferase foi quantificada nas células tratadas utilizando o Luciferase Assay System (Promega). Neste ensaio, 75 ng/mL de GDF-8 fornece 80% de ativação enquanto que 400 ng/mL de MYO-029 fornece 80% de inibição da

construção do gene repórter.

Em reações em paralelo, as células são tratadas com e sem 75 ng/mL da proteína GDF-8 madura, com e sem MYO-029 (ou outro agente modulador de GDF-8) e com e sem as amostras biológicas de teste. O soro humano é obtido de indivíduos sofrendo tratamento com MYO-029 e é diluído 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:40 em tampão. Para diluições menores que 1:10, o soro da amostra de teste é adicionalmente diluído em tampão contendo 10% de soro humano (Bioreclamation, Inc.).

Um ensaio funcional com base em células foi realizado com base em um ensaio com gene repórter que responde a GDF-8 publicado (Pub. da Patente U.S. Nº 2003/0138422 A1) como a seguir: Neste ensaio, 75 ng/mL de GDF-8 foram pré-incubados com 400 ng/mL de MYO-029 (375 nM) e adicionados nas células A204 transferidas com células PGL3 $(pCAGA)_{12}$ na presença e na ausência de uma amostra de soro humano. A amostra de soro humano foi diluída 1 para 20 e comparada com um controle positivo compreendendo soro policlonal anti-MYO-029 de coelho diluído 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, por exemplo. O ensaio pode ser corrido misturando junto a amostra de soro humano ou o anticorpo de coelho de controle positivo com MYO-029 então GDF-8 e adicionando diretamente nas células no RGA ou pré-incubando as amostras de soro humano ou o anticorpo de coelho de controle positivo com MYO-029 durante 1 hora adicionando às células no RGA então adicionando GDF-8 nos poços de amostra.

Um controle positivo de anticorpos neutralizantes para MYO-029 foi desenvolvido como a seguir. Os coelhos foram imunizados com MYO-029 intacto ou com fragmentos da proteína MYO-029 compreendendo o sítio de ligação de MYO-029. A digestão foi realizada para remover a parte Fc do anticorpo MYO-029 para evitar a produção de uma resposta imunológica forte no coelho em relação à região constante deste anticorpo humano. Dois coelhos foram imunizados com o MYO-029 intacto ou digerido. Os sangramentos foram testados em relação à atividade neutralizadora utilizando ensaios de ligação ao ligante. Todos os quatro animais desenvolveram bons

resultados de título de anticorpo e um soro de controle de coelho foi produzido através do agrupamento dos sangramentos de todos os quatro animais.

Todas as publicações, patentes e seqüências biológicas citadas nesta descrição são incorporadas como referência em sua totalidade. Até a extensão em que o material incorporado por referência contradiz ou é incoerente com o presente relatório descritivo, o presente relatório descritivo substituirá qualquer tal material. A citação de quaisquer referências contidas aqui não é uma admissão de que tais referências são a técnica anterior da presente invenção.

A não ser que seja indicado de outra maneira, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, cultura de células, condições de tratamento e assim por diante utilizados no relatório descritivo, incluindo as reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "aproximadamente". Conseqüentemente, a não ser que seja indicado de outra maneira ao contrário, os parâmetros numéricos são aproximações e podem variar dependendo das propriedades desejadas buscadas para serem obtidas pela presente invenção. A não ser que seja indicado de outra forma, o termo "pelo menos" precedendo uma série de elementos deve ser entendido como se referindo a cada elemento na série. Os peritos na técnica reconhecerão ou serão capazes de determinar utilizando não mais que experimentos de rotina, muitos equivalentes para as modalidades específicas da invenção descritas aqui. É pretendido que tais equivalentes sejam abrangidos pelas reivindicações a seguir.

As modalidades dentro do relatório descritivo fornecem uma ilustração das modalidades da invenção e não devem ser interpretadas como limitantes do âmbito da invenção. O perito na técnica reconhece facilmente que muitas outras modalidades são abrangidas pela invenção. Outras modalidades da invenção serão evidentes para os peritos na técnica partindo da consideração do relatório descritivo e da prática da invenção divulgada aqui. É pretendido que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados apenas como exemplos, com um âmbito e um espírito reais da invenção sendo indicados pelas reivindicações a seguir.

Listagem de Referência

<110> Wyeth

<120> "DETECÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A AGENTES MODULADORES DE GDF-8".

<130> 08702.0159-00304

<150> 60/664,643
<151> 2005-03-23

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 375
<212> PRT
<213> humano

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
260 265 270

Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
275 280 285

Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
290 295 300

Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
305 310 315 320

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
325 330 335

Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
340 345 350

Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
355 360 365

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
370 375

<210> 3
<211> 747
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
aactgggggt tcgacccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcgag tggaggcggc 360
ggttcaggcg gaggtggctc tggcggtggc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420
ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccacca ttacctgctc tggacatgca 480
ctgggggaca aatttgtttc ctggtatcag cagggatcag gccagtcccc tgtattggtc 540
atctatgacg atacccagcg gccctcaggg atccctgggc gattctctgg ctccaactct 600
gggaacacag ccactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgaggc tgactatttt 660
tgtcaggcgt gggacagcag cttcgtattc ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctaggt 720
gcggccgcac atcatcatca ccatcac 747

<210> 4
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala His His His His His His
                245
```

<210> 5
<211> 351
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtctc caggacagac agccaccatt 60
acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttcct ggtatcagca gggatcaggc 120
cagtcccctg tattggtcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgggcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actatttttg tcaggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
aaggtcaccg tccta 315

<210> 8
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 9
<211> 747
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
aactgggggt tcgacccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcgag tggaggcggc 360
ggttcaggcg gaggtggctc tggcggtggc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420

```
ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccagca ttacctgctc tggacatgca    480
ctgggggaca aatttgtttc ctggtatcag cagaagccag gccagtcccc tgtattggtc    540
atctatgacg atacccagcg gccctcaggg atccctgagc gattctctgg ctccaactct    600
gggaacacag ccactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgaggc tgactattac    660
tgtcaggcgt gggacagcag cttcgtattc ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctaggt    720
gcggccgcac atcaccatca ccatcac                                       747

<210>  10
<211>  249
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala His His His His His His
                245
```

<210> 11
<211> 351
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
aactgggggt tcgacccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcgag t 351

<210> 12
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtctc caggacagac agccagcatt 60
acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttcct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tattggtcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
aaggtcaccg tccta 315

<210> 14
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

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

<400> 15

Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Gly

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser
1 5

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

<400> 20

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) a adição do agente modulador de GDF-8 a um ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 em um recipiente de reação;

(b) a adição da amostra biológica ao ensaio *in vitro* para uma atividade de GDF-8 no recipiente de reação;

(c) a detecção da modulação da atividade de GDF-8 pela amostra biológica; e

(d) a comparação da modulação da atividade de GDF-8 na presença da amostra biológica com a modulação da atividade de GDF-8 na presença do agente modulador de GDF-8 isoladamente.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1 , em que o ensaio *in vitro* é um immunoensaio que compreende:

(a) o contato do agente modulador de GDF-8 com uma superfície do recipiente de reação;

(b) a adição subseqüente da amostra biológica ao recipiente de reação;

(c) a adição de um agente de detecção ao recipiente de reação; e

(d) a detecção de um complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo associado com a superfície.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o agente de detecção é o agente modulador de GDF-8 com uma marcação que pode ser detectada.

4. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o agente de detecção é uma proteína GDF-8 marcada.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que a marcação é biotina.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a proporção de mols de biotina incorporados aos mols do agente é menor que 5:1.

7. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a proporção de biotina em relação ao agente está entre aproximadamente 0,5:1 até 4:1.

8. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um agente modulador de GDF-8 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) o contato do agente modulador de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação;

(c) a adição de um agente de detecção ao recipiente de reação; e

(d) a detecção de um complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo associado com a superfície do recipiente de reação.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o agente de detecção é o agente modulador de GDF-8 da etapa (a) com uma marcação que pode ser detectada.

10. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o agente de detecção é uma proteína GDF-8 marcada.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que o complexo de agente modulador de GDF-8/anticorpo é detectado através da comparação dos níveis do complexo de agente modulador de GDF-8/proteína GDF-8 marcada na amostra de teste com os níveis em uma amostra de controle.

12. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o agente modulador de GDF-8 é um inibidor de GDF-8.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que o inibidor de GDF-8 é um anticorpo.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo se liga especificamente a GDF-8.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo é MYO-029.

16. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o agente

modulador de GDF-8 é escolhido de:

(a) um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8;

(b) um anticorpo que se liga especificamente a um parceiro de ligação de GDF-8;

(c) um receptor solúvel de GDF-8;

(d) uma proteína ActRIIB;

(e) uma proteína contendo domínio de folistatina;

(f) uma proteína folistatina;

(g) uma proteína GASP-1;

(h) uma proteína GDF-8;

(i) um pró-peptídeo de GDF-8;

(j) um inibidor não protéico;

(k) um ácido nucléico; e

(l) uma molécula pequena.

17. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que a amostra biológica é de um mamífero, ave, réptil ou peixe.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a amostra biológica é de um mamífero.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que o mamífero é um ser humano.

20. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândula mamária, linfa, urina, suor, fluido lacrimal, fluido gástrico, fluido sinovial e muco.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue e plasma.

22. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que a marcação é escolhida de uma enzima, uma marcação de epitopo, uma marcação radioativa, biotina, um corante, uma marcação fluorescente e uma marcação luminescente.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, em que a mar-

cação é biotina.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, em que a proporção de mols de biotina incorporados aos mols de agente de detecção é menor que 5:1.

25. Processo de acordo com a reivindicação 23, em que a proporção de biotina em relação ao agente fica entre aproximadamente 0,5:1 até 4:1.

26. Processo de acordo com a reivindicação 23, que compreende ainda a dição de um conjugado de avidina-enzima.

27. Processo de acordo com a reivindicação 26, que compreende ainda a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima.

28. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um inibidor de GDF-8 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) o contato de um primeiro inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação;

(c) a adição de um segundo inibidor de GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e

(d) a detecção do segundo inibidor de GDF-8 marcado associado com a superfície.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a amostra biológica é de um mamífero, ave, réptil ou peixe.

30. Processo de acordo com a reivindicação 29, em que a amostra biológica é de um mamífero.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30, em que o mamífero é um ser humano.

32. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândula mamária, linfa,

urina, suor, fluido lacrimal, fluido gástrico, fluido sinovial e muco.

33. Processo de acordo com a reivindicação 32, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue e plasma.

34. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o primeiro inibidor de GDF-8 e o segundo inibidor de GDF-8 são o mesmo.

35. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o primeiro inibidor de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8.

36. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que o segundo inibidor de GDF-8 é um anticorpo que se liga especificamente a GDF-8.

37. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a marcação é escolhida de uma enzima, uma marcação de epitopo, uma marcação radioativa, biotina, um corante, uma marcação fluorescente e uma marcação luminescente.

38. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a marcação é biotina.

39. Processo de acordo com a reivindicação 38, que compreende ainda a adição de um conjugado de avidina-enzima.

40. Processo de acordo com a reivindicação 39, que compreende ainda a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima.

41. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) o contato de MYO-029 isolado com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação;

(c) a adição de MYO-029 marcado ao recipiente de reação; e

(d) a detecção de MYO-029 marcado associado com a superfície.

42. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) o fornecimento de uma célula hospedeira que compreende uma construção de gene repórter em um recipiente de reação, em que a construção compreende um elemento de controle que responde a GDF-8 e um gene repórter;

(b) a adição de uma quantidade de proteína GDF-8 madura ao recipiente suficiente para ativar a expressão do gene repórter;

(c) a adição de uma quantidade de MYO-029 ao recipiente da etapa (b) suficiente para modular a ativação de GDF-8 do gene repórter;

(d) a adição de uma amostra biológica ao recipiente de reação da etapa (c); e

(e) a detecção da expressão do gene repórter na presença e na ausência da amostra biológica.

43. Processo de acordo com a reivindicação 41, em que a amostra biológica é de um mamífero, ave, réptil ou peixe.

44. Processo de acordo com a reivindicação 43, em que a amostra biológica é de um mamífero.

45. Processo de acordo com a reivindicação 44, em que o mamífero é um ser humano.

46. Processo de acordo com a reivindicação 41, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândula mamária, linfa, urina, suor, fluido lacrimal, fluido gástrico, fluido sinovial e muco.

47. Processo de acordo com a reivindicação 46, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue e plasma.

48. Processo de acordo com a reivindicação 41, em que a marcação é escolhida de uma enzima, uma marcação de epitopo, uma marcação radioativa, biotina, um corante, uma marcação fluorescente e uma marcação luminescente.

49. Processo de acordo com a reivindicação 48, em que a marcação é biotina.

50. Processo de acordo com a reivindicação 49, em que a pro-

porção média de mols de biotina incorporados em relação aos mols de agente é de pelo menos 5:1.

51. Processo de acordo com a reivindicação 49, em que a proporção média de biotina em relação ao agente é de pelo menos 10:1.

52. Processo de acordo com a reivindicação 49, que compreende ainda a adição de um conjugado de avidina-enzima.

53. Processo de acordo com a reivindicação 52, que compreende ainda a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima.

54. Processo para a detecção de um anticorpo que se liga especificamente a MYO-029 em uma amostra biológica, que compreende:

(a) o contato do MYO-029 isolado com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição da amostra biológica ao recipiente de reação;

(c) a adição do GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e

(d) a detecção do GDF-8 marcado associado com a superfície na presença e na ausência da amostra biológica.

55. Processo de acordo com a reivindicação 54, em que a amostra biológica é de um mamífero, ave, réptil ou peixe.

56. Processo de acordo com a reivindicação 55, em que a amostra biológica é de um mamífero.

57. Processo de acordo com a reivindicação 56, em que o mamífero é um ser humano.

58. Processo de acordo com a reivindicação 54, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue, plasma, amostra de biópsia, amostra de tecido, suspensão de células, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinhal, fluido amniótico, leite, colostro, secreção de glândula mamária, linfa, urina, suor, fluido lacrimal, fluido gástrico, fluido sinovial e muco.

59. Processo de acordo com a reivindicação 54, em que a amostra biológica é escolhida de soro, sangue e plasma.

60. Processo de acordo com a reivindicação 54, em que a marcação é escolhida de uma enzima, uma marcação de epitopo, uma marca-

ção radioativa, biotina, um corante, uma marcação fluorescente e uma marcação luminescente.

61. Processo de acordo com a reivindicação 60, em que a marcação é biotina.

62. Processo de acordo com a reivindicação 61, que compreende ainda a adição de um conjugado de avidina-enzima.

63. Processo de acordo com a reivindicação 62, que compreende ainda a adição de um substrato que altera a coloração, a luminescência ou a fluorescência na presença da enzima.

64. Processo para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo para um primeiro inibidor de GDF-8, o processo compreendendo:

(a) o contato de um primeiro inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição de uma amostra biológica de um indivíduo ao recipiente de reação;

(c) a adição de um segundo inibidor de GDF-8 marcado ao recipiente de reação; e

(d) a detecção de um segundo complexo de inibidor de GDF-8 marcado/anticorpo associado com a superfície, em que a detecção do complexo marcado indica uma resposta imunológica para o primeiro inibidor de GDF-8.

65. Processo para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo para um primeiro inibidor de GDF-8, o processo compreendendo:

(a) o contato de um inibidor de GDF-8 com uma superfície de um recipiente de reação;

(b) a adição de uma amostra biológica de um indivíduo ao recipiente de reação;

(c) a adição de uma proteína GDF-8 marcada ao recipiente de reação; e

(d) a comparação da quantidade de proteína GDF-8 marcada associada com a superfície na amostra de teste em relação a uma amostra de controle, em que a detecção de um nível menor de complexo marcado

indica uma resposta imunológica ao inibidor de GDF-8.

66. Processo para avaliar a resposta imunológica de um indivíduo a um primeiro inibidor de GDF-8, o processo compreendendo:

(a) o fornecimento de uma célula hospedeira que compreende uma construção de gene repórter em um recipiente de reação, em que a construção compreende um elemento de controle que responde a GDF-8 e um gene repórter;

(b) a adição de uma quantidade de proteína GDF-8 madura ao recipiente suficiente para ativar a expressão do gene repórter;

(c) a adição de uma quantidade de MYO-029 ao recipiente da etapa (b) suficiente para modular a ativação de GDF-8 do gene repórter;

(d) a adição de uma amostra biológica ao recipiente de reação da etapa (c); e

(e) a detecção da expressão do gene repórter na presença e na ausência da amostra biológica.

Fig.1

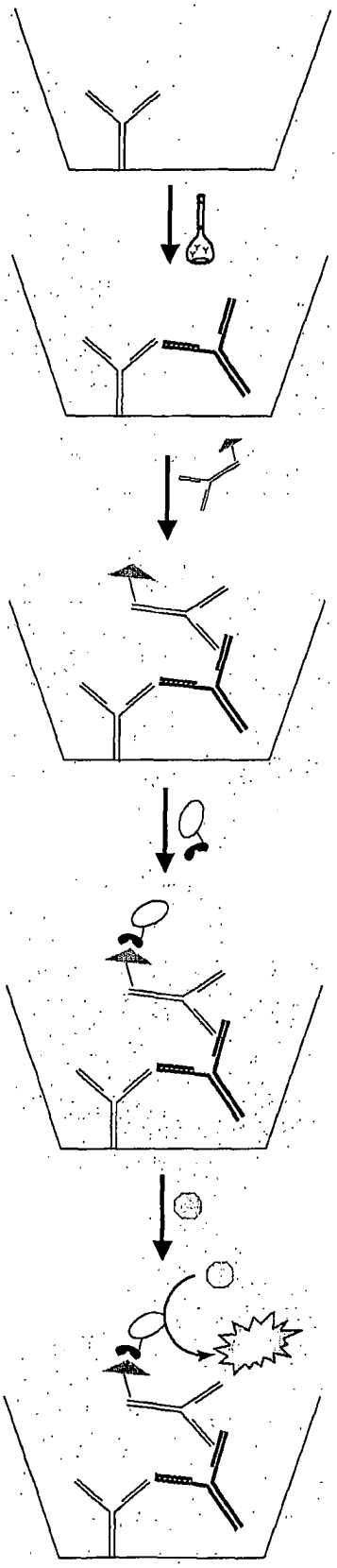
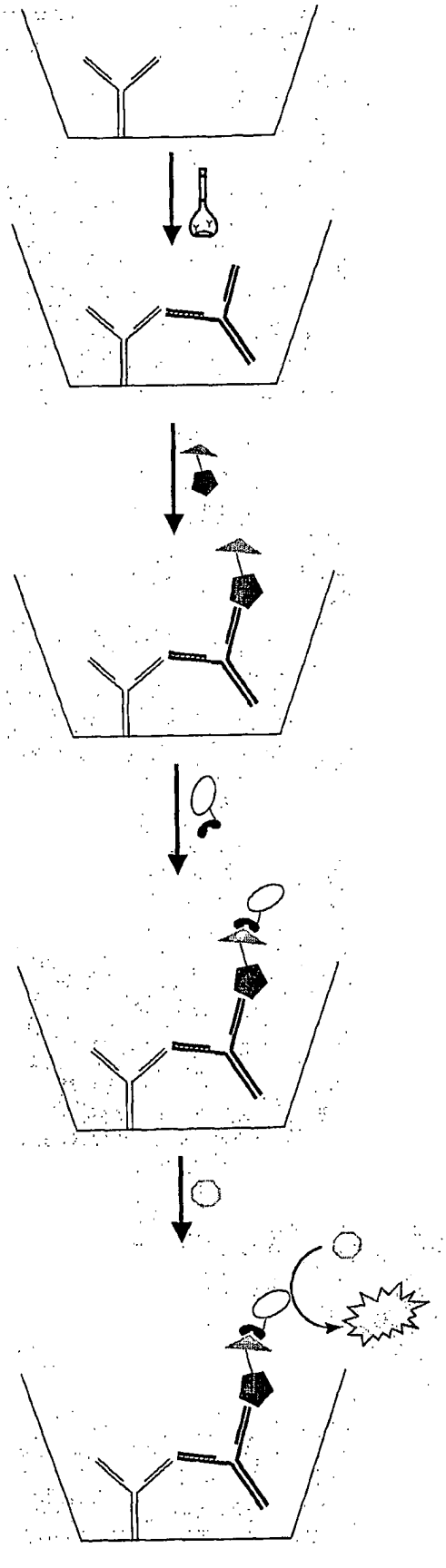


Fig.2



RESUMO

Patente de Invenção: **"DETECÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A AGENTES MODULADORES DE GDF-8"**.

A presente invenção refere-se a processos para a detecção de anticorpos para um agente modulador de GDF-8 tal como, por exemplo, MYO-029, em uma amostra biológica. São também incluídos os processos para a detecção de uma resposta imunológica para um agente modulador de GDF-8. Em particular, são fornecidos aqui processos para avaliar uma resposta imunológica em animais, incluindo seres humanos, a um agente modulador de GDF-8 tal como um inibidor de GDF-8.