

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 642**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016** **PCT/US2016/052014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017** **WO17049011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016** **E 16774748 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021** **EP 3350220**

54 Título: **Anticuerpos anti-pro-miostatina/miostatina latente y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**15.09.2015 US 201562219094 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.11.2021**

73 Titular/es:

**SCHOLAR ROCK, INC. (100.0%)**  
**301 Binney Street, 3rd Floor**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CARVEN, GREGORY, J.;**  
**STRAUB, MICHELLE;**  
**DONOVAN, ADRIANA y**  
**TURNER, KATHERINE, JANE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 881 642 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-pro-miostatina/miostatina latente y usos de los mismos

## 5 CAMPO DE DIVULGACIÓN

**[0001]** Las realizaciones de la presente divulgación pueden incluir moduladores de la actividad del factor de crecimiento. En algunas realizaciones, tales moduladores pueden incluir anticuerpos y pueden modular la actividad y/o biología del miembro de la familia TGF- $\beta$ .

10

## ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

**[0002]** La miostatina es un factor de crecimiento secretado que regula negativamente la masa muscular. Se han descrito mutaciones con pérdida de función en el gen de la miostatina, que conducen a un fenotipo hipermuscular, en bovinos, ovinos, peces, perros y seres humanos. La expresión de miostatina generalmente se limita al músculo esquelético, con bajos niveles de expresión en tejidos adiposos y cardíacos. La inhibición de la señalización de la miostatina conduce a un aumento del tamaño muscular. Los anticuerpos que se unen a la miostatina se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, los documentos US 2013/209489, WO 2006/116269, WO 03/027248, WO 2005/066204, WO 2004/037861, WO 2014/182676 o RC Smith et al., Mol. Cane. Therap., Vol. 14 (7): 1661-1670. Dichos anticuerpos se unen a la miostatina pro latente, proteínas relacionadas (como GDF11) y/o isoformas maduras de miostatina.

## RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

**[0003]** La invención se define por las reivindicaciones y los otros aspectos o formas de realización expuestas en el presente documento no están comprendidos en el alcance de las reivindicaciones y son sólo para información.

**[0004]** Los aspectos de la divulgación se refieren, en algunas realizaciones, a anticuerpos que se unen específicamente a formas de miostatina (por ejemplo, proMiostatina y/o miostatina latente). Por ejemplo, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se unen específicamente a una o más de una forma proforma y/o una forma latente de miostatina, tal como proMiostatina y/o miostatina latente. En ciertos aspectos, la divulgación se basa en el sorprendente descubrimiento de anticuerpos proporcionados en el presente documento que se unen específicamente a proGDF8 puro o sustancialmente puro (también denominado proMiostatina). En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados aquí inhiben la señalización de miostatina. En algunas realizaciones, la inhibición de la señalización de miostatina es útil para aumentar la masa muscular o prevenir la atrofia muscular. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se unen a y previenen la escisión de la miostatina por una proproteína convertasa y/o una proteasa toloide. La prevención de la escisión de la proMiostatina o la miostatina latente, en algunas realizaciones, evita la activación de la miostatina. Otros aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos que tienen afinidad por un antígeno que es sensible al pH. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos sensibles al pH son eficaces para eliminar antígenos del suero. Además, en algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento son anticuerpos de barrido que pueden eliminar eficazmente antígenos (por ejemplo, proMiostatina y/o miostatina latente) del suero.

**[0005]** Los aspectos de la presente divulgación incluyen un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDRH3) que comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 10-11. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a la miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena ligera comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDRL3) que comprende una secuencia como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 22-23. En otra realización, dicho anticuerpo comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde CDRH1 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3, CDRH2 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, CDRH3 comprende una secuencia como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 10-11, CDRL1 comprende una secuencia como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 12-17, CDRL2 comprende una secuencia como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 18-21, y CDRL3 comprende una secuencia como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 22-23.

**[0006]** En algunas realizaciones, dicho CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 2, CDRH2 comprende una secuencia como se expone conjunto en la SEQ ID NO: 4 o 5, CDRH3 comprende una secuencia como se expone en: 10, CDRL1 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 12 o 13, CDRL2 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 18 o 19, y CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 22.

**[0007]** En otra realización, dicho CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 6 o 7, CDRH3 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 11, CDRL1 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 14 o 15, CDRL2 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 20 o 21, y CDRL3 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 23.

- 5 **[0008]** En otras realizaciones, CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 8 o 9, CDRH3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 11, CDRL1 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 16 o 17, CDRL2 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 20 o 21, y CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 23.
- 10 **[0009]** En otra realización, dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada del dominio variable como se expone en cualquiera una de las SEQ ID NOs: 25-29. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 30-35.
- 15 **[0010]** Otros aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo que se une específicamente a miostatina pro/latente y que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en la que el dominio variable de cadena ligera comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDRL3) que comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 22-23. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 30.
- 20 **[0011]** Algunos aspectos de la descripción se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO 29. En algunas realizaciones, el polipéptido es un dominio de cadena pesada variable. En algunas realizaciones, el polipéptido es al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) idéntico a cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, o SEQ ID NO 29.
- 25 **[0012]** Algunos aspectos de la descripción se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consta de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO 35. En algunas realizaciones, el polipéptido es un dominio de cadena ligera variable. En algunas realizaciones, el polipéptido es al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) idéntico a cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, o SEQ ID NO 35.
- 30 **[0013]** Otro aspecto de la descripción incluye un anticuerpo que compite por la unión a miostatina pro/latente con un anticuerpo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo se une a la miostatina pro/latente en el mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente. En otra realización, un anticuerpo compite por unirse a miostatina pro/latente con una constante de disociación de equilibrio, Kd, entre el anticuerpo y la miostatina pro/latente de menos de  $10^{-6}$  M. En otras realizaciones, la Kd de dicho anticuerpo está en una gama de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M.
- 35 **[0014]** En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un diacuerpo, un anticuerpo quimérico, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento Fv. En otra realización, un anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otra realización, un anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende un marco que tiene una secuencia de línea germinal humana. En otra realización, un anticuerpo comprende un dominio constante de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en dominios constantes IgG, IgG1, IgG<sub>2</sub>, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgM e IgE. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende un dominio constante de IgG<sub>4</sub>. En otras realizaciones, un anticuerpo comprende un dominio constante de IgG<sub>4</sub> que tiene una sustitución de la cadena principal de Ser por Pro que produce una bisagra similar a IgG1 y permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. En otra realización, un anticuerpo se conjuga con un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente fluorescente, un agente luminiscente, un agente enzimático y un agente radiactivo.
- 40 **[0015]** En otra realización, un anticuerpo se une específicamente a miostatina pro/latente en comparación con miostatina madura. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a la miostatina pro/latente en comparación con otro miembro de la familia del factor de crecimiento transformante Beta. En otra realización, dicho miembro es GDF11 o Activina.
- 45 **[0016]** Otro aspecto de la descripción incluye un anticuerpo que se une específicamente miostatina pro/latente y que inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por una proteasa tolloide. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por una proteasa toloide con una CI<sub>50</sub> de menos de 1 mM. En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene reactividad cruzada con miostatina pro/latente humana y murina. En otras realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a la miostatina pro/latente en comparación con GDF11 o Activina. En otra realización, un anticuerpo se une específicamente a la miostatina pro/latente en comparación con la miostatina madura.
- 50 **[0017]** Otro aspecto de la descripción incluye un método para reducir la activación del receptor de miostatina en las células presentes en un medio que comprende miostatina pro/latente, comprendiendo el método suministrar al medio un anticuerpo descrito anteriormente en una cantidad eficaz para inhibir la activación proteolítica de la miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, el medio comprende además una proproteína convertasa. En otras realizaciones, el medio comprende además una proteasa toloide. En otra realización, se administra un anticuerpo al medio en una cantidad eficaz para inhibir la activación proteolítica de la miostatina pro/latente por la proteasa toloide. En algunas realizaciones, la célula es *in vitro*. En otras realizaciones, la célula está *in vivo*.
- 55
- 60
- 65

- 5 **[0018]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una miopatía, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía primaria. En otra realización, la miopatía primaria comprende atrofia por desuso. En otras realizaciones, la atrofia por desuso se asocia con fractura de cadera, reemplazo articular electivo, miopatía en cuidados críticos, lesión de la médula espinal o accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía secundaria, en la que la pérdida de músculo es secundaria a una patología de la enfermedad. En otras realizaciones, la miopatía secundaria comprende denervación, debilidad muscular genética o caquexia. En otra realización, la miopatía secundaria es una denervación asociada con esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal. En algunas realizaciones, la miopatía secundaria es una debilidad muscular genética asociada con una distrofia muscular. En otras realizaciones, la miopatía secundaria es una caquexia asociada con insuficiencia renal, SIDA, una afección cardíaca, cáncer o envejecimiento.
- 15 **[0019]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con el envejecimiento. Las enfermedades y afecciones ejemplares relacionadas con el envejecimiento incluyen, sin limitación, sarcopenia (pérdida de músculo relacionada con la edad), fragilidad y deficiencia de andrógenos.
- 20 **[0020]** Otro aspecto de la descripción incluye un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a atrofia por desuso/trauma. Ejemplos de enfermedades y afecciones relacionadas con la atrofia/trauma por desuso incluyen, sin limitación, debilidad muscular relacionada con el tiempo pasado en una unidad de cuidados intensivos (UCI), reemplazo de cadera/articulación, fractura de cadera, accidente cerebrovascular, reposo en cama, LME, lesión del manguito rotador, reemplazo de rodilla, fractura ósea y quemaduras.
- 25 **[0021]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición neurodegenerativa. Las enfermedades o afecciones neurodegenerativas ejemplares incluyen, sin limitación, atrofia muscular espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 30 **[0022]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a la caquexia. Ejemplos de enfermedades y afecciones relacionadas con la caquexia incluyen, sin limitación, cáncer, insuficiencia cardíaca crónica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad renal crónica (ERC).
- 35 **[0023]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con las enfermedades raras. Las enfermedades y afecciones raras ejemplares incluyen, sin limitación, osteogénesis imperfecta, miositis por cuerpos de inclusión esporádicos y leucemia linfoblástica aguda.
- 40 **[0024]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con un trastorno metabólico y/o la composición corporal. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es obesidad (por ejemplo, obesidad grave), Prader-Willi, diabetes de tipo II o anorexia. Sin embargo, enfermedades o afecciones adicionales relacionadas con trastornos metabólicos y/o composición corporal están dentro del alcance de esta descripción.
- 45 **[0025]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a miopatías congénitas. Las miopatías congénitas ejemplares incluyen, sin limitación, miopatía miotubular ligada al cromosoma X, miopatía centronuclear autosómica dominante, miopatía centronuclear autosómica recesiva, miopatía nemalínica y miopatía por desproporción del tipo de fibras congénitas.
- 50 **[0026]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a las distrofias musculares. Distrofias musculares ejemplares incluyen, sin limitación, distrofias musculares de Duchenne, de Becker, facioescapulohumeral (FSH) y de miembros-cinturas.
- 55 **[0027]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición uroginecológica relacionada, trastornos de glotis (estenosis), miopatía extraocular, túnel carpiano, síndrome de Guillain-Barre, o de osteosarcoma.
- 60 **[0028]** En algunas realizaciones, los resultados del tratamiento en la mejora de la fuerza muscular en el sujeto. En otras realizaciones, el tratamiento da como resultado un estado metabólico mejorado en el sujeto.
- 65 **[0029]** En algunas realizaciones, un anticuerpo se administra a una dosis en un rango de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg. En otra realización, se administra un anticuerpo a una dosis en un intervalo de 0,3 mg/kg a 30 mg/kg.
- [0030]** En algunas realizaciones, un anticuerpo se administra al sujeto por vía intravenosa. En otras realizaciones, se administra un anticuerpo al sujeto por vía subcutánea. En otra realización, se administra un anticuerpo al sujeto en múltiples ocasiones. En algunas realizaciones, dichas múltiples administraciones se realizan al menos una vez al mes. En otra realización, dichas múltiples administraciones se realizan al menos semanalmente.



- 5 **[0031]** Un aspecto adicional de la descripción incluye una composición que comprende cualquier anticuerpo descrito anteriormente y un portador. En algunas realizaciones, dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, un anticuerpo y un portador están en forma liofilizada. En otra realización, un anticuerpo y un portador están en solución. En algunas realizaciones, se congelan un anticuerpo y un portador. En otras realizaciones, un anticuerpo y un portador se congelan a una temperatura menor o igual a -65°C.
- 10 **[0032]** Otros aspectos de la divulgación incluyen un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR): CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en los que CDRH3 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10 o 11. En algunas realizaciones, dicha CDRH1 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 1, 2 o 3. En otras realizaciones, CDRH2 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9.
- 15 **[0033]** Otro aspecto de la presente descripción incluye un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRL3 comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 22. En algunas realizaciones, dicha CDRL1 comprende una secuencia como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 12-17. En otras realizaciones, CDRL2 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 18-21.
- 20 **[0034]** Otros aspectos de la presente divulgación incluyen un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 38-49.
- [0035]** Otro aspecto de la divulgación incluye una célula aislada que comprende un ácido nucleico aislado descrito anteriormente.
- 25 **[0036]** La presente descripción, en algunos aspectos, incluye métodos de evaluación de una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene una miopatía. En algunas realizaciones, el método comprende: preparar una mezcla de reacción inmunológica que comprende proteína de una muestra biológica obtenida del sujeto y un anticuerpo que se une específicamente a la -Miostatina pro/latente; mantener la mezcla de reacción inmunológica en condiciones que permitan que se formen complejos de unión entre el anticuerpo y una -Miostatina pro/latente; y determinar el grado de formación del complejo de unión. En algunas realizaciones, el método comprende: preparar una mezcla de reacción inmunológica que comprende proteína de una muestra biológica obtenida del sujeto y un anticuerpo que se une específicamente a pro-miostatina; mantener la mezcla de reacción inmunológica en condiciones que permitan que se formen complejos de unión entre el anticuerpo y una pro-miostatina; y determinar el grado de formación del complejo de unión. En algunas realizaciones, el método comprende: preparar una mezcla de reacción inmunológica que comprende proteína de una muestra biológica obtenida del sujeto y un anticuerpo que se une específicamente a la miostatina latente; mantener la mezcla de reacción inmunológica en condiciones que permitan que se formen complejos de unión entre el anticuerpo y una miostatina latente; y determinar el grado de formación del complejo de unión. En algunas realizaciones, el método comprende: preparar una mezcla de reacción inmunológica que comprende proteína de una muestra biológica obtenida del sujeto y un anticuerpo que se une específicamente a la miostatina madura; mantener la mezcla de reacción inmunológica en condiciones que permitan que se formen complejos de unión entre el anticuerpo y una miostatina madura; y determinar el grado de formación del complejo de unión.
- 30 **[0037]** La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.
- 35 **[0038]** En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende la SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO: 6, y una secuencia de CDRH3 que comprende la SEQ ID NO: 11; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO: 20 y una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO: 23.
- 40 **[0039]** En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 26. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 32.
- 45 **[0040]** En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 27. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 33.
- 50 **[0041]** En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende la SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO: 8 y una secuencia de CDRH3 que comprende la SEQ ID NO: 11; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO: 20 y una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO: 23.
- 55
- 60
- 65

**[0042]** En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 28. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 34.

**[0043]** En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 29. En una realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 35.

**[0044]** En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG<sub>4</sub>. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG<sub>4</sub> que tiene una sustitución de la cadena principal de Ser por Pro que produce una bisagra similar a IgG1 y permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas.

**[0045]** En una realización, el anticuerpo se une específicamente a miostatina pro/latente. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a la pro-miostatina. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a la miostatina latente. En una realización, el anticuerpo no se une a la miostatina madura.

**[0046]** En una realización, el anticuerpo inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por la proteasa toloide. En una realización, el anticuerpo inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por la proteasa toloide con una CI<sub>50</sub> de menos de 1 µM.

**[0047]** En una realización, el anticuerpo es de reacción cruzada con miostatina pro/latente humana y murina. En otra realización, el anticuerpo se une a miostatina pro/latente pero no se une a GDF11 o activina.

**[0048]** En un aspecto, se describe aquí un método para reducir la activación del receptor de miostatina en las células presentes en un medio que comprende miostatina pro/latente, el método que comprende suministrar al medio de un anticuerpo descrito en el presente documento en una cantidad eficaz para inhibir la activación proteolítica de la miostatina pro/latente. En una realización, el medio comprende una proproteína convertasa. En otra realización, el medio comprende una proteasa toloide. En una realización, la célula es in vitro. En otra realización, la célula está in vivo.

**[0049]** En otro aspecto, se describe aquí un método de tratamiento de un sujeto que tiene una miopatía, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente.

**[0050]** En una realización, la miopatía es una miopatía primaria. En otra realización, la miopatía primaria es la atrofia por desuso. En una realización, la atrofia por desuso está asociada con fractura de cadera, reemplazo de articulación electivo, miopatía de cuidados críticos, lesión de la médula espinal y/o accidente cerebrovascular.

**[0051]** En otra realización, la miopatía es una miopatía secundaria en la que la pérdida de músculo es secundaria a una enfermedad patológica. En una realización, la miopatía secundaria comprende denervación, debilidad muscular genética o caquexia. En otra realización, la miopatía secundaria es una denervación asociada con esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal. En otra realización más, la miopatía secundaria es una debilidad muscular genética asociada con una distrofia muscular. En una realización, la miopatía secundaria es una caquexia asociada con insuficiencia renal, SIDA, una afección cardíaca, cáncer o envejecimiento.

**[0052]** En una realización, la administración da como resultado la mejora de la fuerza muscular en el sujeto. En una realización, la administración da como resultado un mejor estado metabólico en el sujeto.

**[0053]** En una realización, el anticuerpo se administra a una dosis en un rango de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se administra a una dosis en un intervalo de 0,3 mg/kg a 30 mg/kg.

**[0054]** En una realización, el anticuerpo se administra al sujeto por vía intravenosa. En otra realización, el anticuerpo se administra al sujeto por vía subcutánea.

**[0055]** En una realización, el anticuerpo se administra al sujeto en múltiples ocasiones. En una realización, las múltiples administraciones se realizan al menos una vez al mes. En otra realización, las múltiples administraciones se realizan al menos semanalmente.

**[0056]** En otro aspecto, se describe aquí una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición es una composición liofilizada. En otra realización, la composición es una composición líquida. En una realización, la composición se congela. En una realización, la composición se congela a una temperatura menor o igual a -65°C.

**[0057]** En otro aspecto, se describe aquí una jeringa que comprende una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

**[0058]** La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 45.

[0059] En otro aspecto, se describe aquí un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la región variable que comprende una secuencia CDRH1 que comprende la SEQ ID NO: 6; 1, una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO SEC y una secuencia CDRH3 que comprenden SEQ ID NO: 11; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO: 20 y una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO: 23.

[0060] En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 40. En una realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 46.

[0061] En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 41. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 47.

[0062] En otro aspecto, se describe aquí un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la región variable que comprende una secuencia CDRH1 que comprende la SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO: 8, y una secuencia CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO: 20 y una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO: 23.

[0063] En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 42. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 48.

[0064] En una realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 43. En otra realización, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de SEQ ID NO: 49.

[0065] En otro aspecto, se describe aquí una célula aislada que comprende un ácido nucleico aislado descrito en este documento.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

##### [0066]

Las Figuras 1A-1B muestran la estructura del dominio de miostatina y el ensamblaje de proMiostatina. Figura 1A muestra miostatina secretada como proproteína, con un prodominio inhibidor seguido de un dominio de factor de crecimiento C-terminal, que existe como un dímero enlazado por enlaces disulfuro. Figura 1B muestra la proteína precursora ensamblada en una conformación inactiva donde el prodominio (gris oscuro) encierra el factor de crecimiento (gris claro) con un ensamblaje de "camisa de fuerza". Esta Figura es una adaptación de la estructura del TGFβ1 latente (Shi et al. Nature 2011).

La Figura 2 muestra que la activación de Miostatina implica dos eventos de proteasa distintos, generando tres especies principales de Miostatina. La proteína precursora biosintética, proMiostatina, es procesada por dos proteasas separadas. La escisión de la proMiostatina (y proGDF 11) se lleva a cabo mediante una proproteína convertasa, como Furina/PACE3 (Enzima 3 de escisión de aminoácidos básicos emparejados) o PCSK5 (Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 5), que corta en un sitio RXXR conservado entre el prodominio y el factor de crecimiento maduro. Esta escisión produce un complejo latente, en donde el prodominio protege al factor de crecimiento maduro para que no se una a sus receptores. La activación y liberación del factor de crecimiento activo se logra después de la escisión por una proteasa adicional de la familia BMP/toloide, como TLL-2 (proteína 2 similar a toloide) o BMP1 (proteína morfogénica ósea 1). Estos eventos de escisión producen una forma madura de miostatina, que puede denominarse miostatina activa o miostatina madura.

Las Figuras 3A-3C muestran que Ab1 bloquea la escisión de la proMiostatina por miembros de la familia toloide de proteasas. Las muestras de miostatina latente, preincubadas con cantidades crecientes de Ab1, se analizaron en un ensayo de activación de miostatina. Después del análisis de la liberación de miostatina mediante ensayo indicador (Figura 3A), las muestras se analizaron luego en condiciones reductoras y se sondaron mediante transferencia Western con un anticuerpo generado hacia el prodominio de Miostatina (Figura 3B). Una banda de ~ 18 kDa 7 (recuadro), correspondiente a la porción ARM del prodominio generado después de la escisión de toloides, disminuyó proporcionalmente con dosis crecientes de Ab1. Los estándares latentes y proMiostatina (45 ng cargados) muestran la migración de proMiostatina a ~ 50 kDa, y el prodominio a ~ 37 kDa. Figura 3C muestra que la activación de Miostatina implica dos eventos de proteasa distintos, generando tres especies principales de Miostatina. La proteína precursora biosintética, proMiostatina, es procesada por dos proteasas separadas. La escisión de la proMiostatina (y proGDF 11) se lleva a cabo mediante una proproteína convertasa, como Furina/PACE3 (Enzima 3 de escisión de aminoácidos básicos emparejados) o PCSK5 (Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 5), que corta en un sitio RXXR conservado entre el prodominio y el factor de crecimiento maduro. Esta escisión produce un complejo latente, en donde el prodominio protege al factor de crecimiento maduro para que no se una a sus receptores. Veá la Figura 3B, que ilustra la posible inhibición de una proteasa toloide, bloqueando una mayor escisión de la proMiostatina. La activación y liberación del factor de crecimiento activo se logra después de la escisión por una proteasa adicional de la familia BMP/toloide, como TLL-2 (proteína 2 similar a toloide) o BMP1 (proteína morfogénica ósea 1).

La Figura 4 muestra el rendimiento del anticuerpo Ab1 parental y otros candidatos en el ensayo indicador basado en células. Después de una reacción de proteólisis durante la noche con enzimas de las familias de proteasa proproteína-convertasa y toloide, se midió la liberación del factor de crecimiento maduro usando un ensayo indicador basado en CAGA en células 293T. Los resultados se compararon con las reacciones de control para calcular la fracción de proMiostatina o proGDF11 que se liberó en el ensayo. Se muestra la desviación estándar para un promedio de 3 réplicas, pero no es visible en el gráfico para la mayoría de los puntos de datos debido a su baja magnitud.

La Figura 5 muestra gráficamente que los anticuerpos Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 no inhiben la activación de proGDF11.

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo que evalúa el cambio porcentual medio del peso corporal. Los animales se pesaron diariamente y se calculó el porcentaje de cambio de peso desde el día 0. Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM. Los datos de cambio porcentual medio para cada grupo el día 42 del estudio se analizaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak en comparación con el grupo de control PBS,  $**p < 0,01$ .

Las Figuras 7A-7D muestran los resultados de un ensayo que evalúa los pesos de los tejidos. Figura 7A muestra el peso medio del gastrocnemio. Figura 7B muestra el peso medio del pectoral. Figura 7C muestra el peso medio del sóleo. Figura 7D muestra el peso medio del tríceps. La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak en comparación con el Grupo de control de vehículos (Grupo 1). Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM.  $**p < 0,01$ . Las barras indican de izquierda a derecha los Grupos 1-5.

Las Figuras 8A-8C muestran los resultados de un ensayo que evalúa los pesos de los tejidos. Figura 8A muestra el peso medio del tibial anterior. Figura 8B muestra el peso medio del diafragma. Figura 8C muestra el peso medio del cuádriceps. La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak en comparación con el Grupo de control de vehículos (Grupo 1). Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM.  $*p < 0,05$ . Las barras indican de izquierda a derecha los Grupos 1-5.

Las Figuras 9A-9B muestran los resultados de un ensayo que evalúa el porcentaje medio del peso corporal y el cambio de masa magra. Figura 9A es un gráfico que muestra el cambio de peso porcentual calculado desde el día 0 en animales pesados dos veces por semana durante todo el estudio. En la Figura 9B, los animales se sometieron a EchoMRI (QNMRI) para medir la composición corporal en los días -4, 7, 14, 21 y 28 y se calculó el porcentaje de cambio de masa magra desde el Día 0. Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM. Tanto para el peso corporal como para la masa magra, los datos de cambio porcentual medio para cada grupo el día 28 del estudio se analizaron utilizando un ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak en comparación con el Grupo de control de IgG (Grupo 2).  $***p < 0,0005$ ,  $**p < 0,005$ ,  $*p < 0,05$ , ns (no significativo).

Las Figuras 10A-10D son gráficos que muestran los resultados de un ensayo que evalúa los pesos de los músculos. Figura 10A muestra el peso medio del cuádriceps, la Figura 10B muestra el peso medio del gastrocnemio, la Figura 10C muestra el peso medio del tibial anterior, y la Figura 10D muestra el peso medio del diafragma. La diferencia porcentual en los pesos musculares medios de los grupos tratados con Ab1 en comparación con el grupo de control de IgG se anota encima de cada barra. La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak en comparación con el Grupo de control de IgG (Grupo 2). Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM.  $****p < 0,0001$ ,  $***p < 0,0005$ ,  $**p < 0,005$ ,  $*p < 0,05$ , ns (no significativo).

Las Figuras 11A-11B muestran los resultados de un ensayo que evalúa el porcentaje medio del peso corporal y el cambio de masa magra. Figura 11A muestra el porcentaje de cambio de peso desde el día 0 calculado a partir de animales pesados dos veces por semana durante todo el estudio. (Figura 11B) Los animales se sometieron a EchoMRI (QNMRI) para medir la composición corporal en los días -1, 6 y 13 y se calculó el porcentaje de cambio de masa magra desde el Día -1. PBS = solución salina tamponada con fosfato, Dex = dexametasona, IgG (20) = anticuerpo de control IgG dosificado a 20 mg/kg/semana, Ab1 (20) = anticuerpo Ab1 dosificado a 20 mg/kg/semana y Ab1 (2) = anticuerpo Ab1 dosificado a 2 mg/kg/semana. Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM. Los datos de cambio porcentual medio para cada grupo el día 14 (para el peso corporal) y el día 13 (para la masa magra) se analizaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett frente al grupo 1 ( $****p < 0,0001$ ,  $***p < 0,0005$ ,  $**p < 0,005$ ,  $*p < 0,05$ ) y frente al grupo 5 ( $++++p < 0,0001$ ,  $+++p < 0,0005$ ,  $++p < 0,005$ ,  $+p < 0,05$ ). ns (no significativo).

Las Figuras 12A-12D son gráficos que muestran los resultados de un ensayo que evalúa los pesos de diferentes músculos. Figura 12A muestra el peso medio del gastrocnemio (gramos), la Figura 12B muestra el peso medio del cuádriceps (gramos), la Figura 12C muestra el cambio porcentual medio del peso del gastrocnemio frente a los animales de control tratados con PBS (IP) y agua potable normal (Grupo 1), y la Figura 12D muestra el porcentaje medio de cambio de peso del cuádriceps frente a los animales de control tratados con PBS (IP) y agua potable normal (Grupo 1). PBS = solución salina tamponada con fosfato, Dex = dexametasona, IgG (20) = anticuerpo de control IgG dosificado a 20 mg/kg/semana, Ab1 (20) = anticuerpo Ab1 dosificado a 20 mg/kg/semana y Ab1 (2) = anticuerpo Ab1 dosificado a 2 mg/kg/semana. Para las Figuras 12A-12B, las barras de error representan la desviación estándar (DE). Para las Figuras 12C-12D, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett frente al grupo 1 ( $****p < 0,0001$ ,  $***p < 0,0005$ ,  $**p < 0,005$ ,  $*p < 0,05$ ) y frente al grupo 5 ( $++++p < 0,0001$ ,  $+++p < 0,0005$ ,  $++p < 0,005$ ,  $+p < 0,05$ ). ns (no significativo). Las barras indican de izquierda a derecha, PBS, agua; PBS, dex; Control de IgG; Ab1 (20); y Ab1 (2).

Las Figuras 13A-13B muestran los resultados de un ensayo que evalúa el porcentaje medio de peso corporal y el cambio de masa magra. Figura 13A muestra el cambio de peso porcentual desde el día 0 calculado para los

animales que se pesaron dos veces por semana durante el estudio. Figura 13B muestra el porcentaje de cambio de masa magra desde el día -1 calculado a partir de animales que se sometieron a EchoMRI (QNMR) para medir la composición corporal en los días -1, 7 y 14. PBS = solución salina tamponada con fosfato, IgG (20) = anticuerpo de control IgG dosificado a 20 mg/kg/semana, Ab1 (20) = anticuerpo Ab1 dosificado a 20 mg/kg/semana y Ab1 (2) = anticuerpo Ab1 dosificado a 2 mg/kg/semana. Los datos representan medias de grupo  $\pm$  SEM.

Las Figuras 14A-14D muestran los resultados de un ensayo que evalúa los pesos de los músculos. Figura 14A muestra el peso medio del gastrocnemio de la pierna escayolada (gramos), la Figura 14B muestra el peso medio del cuádriceps de la pierna escayolada (gramos), la Figura 14C muestra el porcentaje medio de cambio en el peso del gastrocnemio frente a los animales de control tratados con PBS (IP) y no fundidos (Grupo 1), y la Figura 14D muestra el porcentaje medio de cambio de peso del cuádriceps frente a los animales de control tratados con PBS (IP) y no enyesados (Grupo 1). PBS = solución salina tamponada con fosfato, IgG (20) = anticuerpo de control IgG dosificado a 20 mg/kg/semana, Ab1 (20) = anticuerpo Ab1 dosificado a 20 mg/kg/semana y Ab1 (2) = anticuerpo Ab1 dosificado a 2 mg/kg/semana. Para las Figuras 14A-14B, las barras de error representan la desviación estándar (DE). Para las Figuras 14C-14D, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett frente al grupo 1 (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,0005$ , \*\* $p < 0,005$ , \* $p < 0,05$ ) y vs. grupo 5 (++++ $p < 0,0001$ , +++ $p < 0,0005$ , ++ $p < 0,005$ , + $p < 0,05$ ). ns (no significativo). Las barras indican de izquierda a derecha, PBS, sin yeso; PBS, fundido; Control de IgG (2), fundido; Ab1 (20), fundido; y Ab1 (2), fundido.

La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo que evalúa el cambio de masa magra en el día 21 (arriba a la derecha) y el día 28 (arriba a la izquierda). Es también representa el porcentaje de cambio en la masa magra en tres dosis diferentes, 20 mg/kg/semana (parte inferior izquierda), 2 mg/kg/semana (inferior medio), y 0,5 mg/kg/semana (parte inferior derecha) de los anticuerpos ensayados, Control de PBS y control de IgG. La evaluación estadística se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett frente al grupo 1 (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) y vs. el control de IgG. Para los dos paneles superiores, las barras de izquierda a derecha son: PBS; IgG Ctrl 20 mg/kg/semana; Ab1 20 mg/kg/semana; Ab1 2 mg/kg/semana; Ab1 0,5 mg/kg/semana; Ab2 20 mg/kg/semana; Ab2 2 mg/kg/semana; Ab2 0,5 mg/kg/semana; Ab4 20 mg/kg/semana; Ab4 2 mg/kg/semana; Ab4 0,5 mg/kg/semana; Ab6 20 mg/kg/semana; Ab6 2 mg/kg/semana; y Ab6 0,5 mg/kg/semana. Para el panel inferior izquierdo (20 mg/kg/semana), los puntos de datos correspondientes al día 28 después de la dosificación, de arriba a abajo, corresponden a Ab1, Ab4, Ab2, Ab6, control de IgG y PBS. Para el panel central inferior (2 mg/kg/semana), los puntos de datos correspondientes al día 28 después de la dosificación, de arriba a abajo, corresponden a Ab2, Ab1, Ab6, Ab4, control de IgG y PBS. Para el panel inferior derecho (0,5 mg/kg/semana), los puntos de datos, correspondientes al día 28 después de la dosificación, de arriba a abajo, corresponden al control de IgG Ab1, Ab2, PBS, Ab4 y Ab6.

Las Figuras 16A-16B muestran la estructura del dominio y la evaluación de las formas precursoras de miostatina. Figura 16A muestra la estructura del dominio de proMiostatina y miostatina latente, con los sitios de escisión de proteasa indicados. Figura 16B muestra proMiostatina escindida parcialmente por proproteína convertasa en un gel SDS PAGE. En condiciones reductoras, las bandas de proteínas consistían en el monómero de proMiostatina (~ 50 kD), prodominio (~ 37 kD) y factor de crecimiento (12,5 kD).

Las Figuras 17A-17B muestran que Ab1 es específico para la miostatina. Figura 17A muestra que Ab1 se une específicamente a proMiostatina y Miostatina latente, sin que se observe unión a otros miembros de la superfamilia TGFB, más notablemente las formas correspondientes de GDF11. Se administró Ab1 a una concentración alta (50 ug/ml) a puntas Forte-Bio BLI recubiertas con el antígeno indicado y se midieron las velocidades de activación y desactivación para obtener un valor de Kd aproximado. La magnitud de la respuesta del biosensor, que indica un evento de unión, se representa gráficamente mediante barras negras y el Kd calculado se indica en naranja. Figura 17B muestra que Ab1 bloquea la activación de la proMiostatina, pero no de la proGDF 11. Después de una reacción de proteólisis durante la noche con enzimas de las familias de la proproteína-convertasa y la proteasa toloide, se midió la liberación del factor de crecimiento maduro utilizando un ensayo informador basado en CAGA en células 293T. Los resultados se compararon con las reacciones de control para calcular la fracción de proMiostatina o proGDF11 que se liberó en el ensayo.

Las Figuras 18A-18C muestran la respuesta a la dosis de SCID con los anticuerpos candidatos. Figura 18A muestra el peso muscular del gastrocnemio y la Figura 18B muestra el peso muscular del cuádriceps. Figura 18C muestra los cambios porcentuales en el peso muscular medio en comparación con el control PBS. Las barras de las Figuras 18A-18B de izquierda a derecha son: PBS; IgG Ctrl 20 mg/kg/semana; Ab1 20 mg/kg/semana; Ab1 2 mg/kg/semana; Ab1 0,5 mg/kg/semana; Ab2 20 mg/kg/semana; Ab2 2 mg/kg/semana; Ab2 0,5 mg/kg/semana; Ab4 20 mg/kg/semana; Ab4 2 mg/kg/semana; Ab4 0,5 mg/kg/semana; Ab6 20 mg/kg/semana; Ab6 2 mg/kg/semana; y Ab6 0,5 mg/kg/semana.

La Figura 19 muestra los resultados de un estudio de duración de acción que compara Ab1 con un anticuerpo de miostatina existente (AbMyo). Se utilizó PBS como control negativo; se utilizó IgG como control positivo. El cambio de masa magra se examinó con diferentes protocolos de dosificación después de 21 días.

La Figura 20 es un esquema que ilustra un ensayo que reconstituye la activación de miostatina *in vitro*.

Las Figuras 21A-21B muestran la cadena pesada (Figura 21A; SEQ ID NO: 50) y la cadena ligera (Figura 21B; SEQ ID NO: 51) de un anticuerpo monoclonal humanizado (Ab2) del subtipo IgG<sub>4</sub> con Prolina sustituida por Serina. Esto genera una secuencia de bisagra similar a IgG1 y minimiza la formación incompleta de puentes disulfuro entre cadenas que es característica de IgG<sub>4</sub>. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

están subrayadas. Secuencia NST en negrita: sitio de secuencia consenso de glicosilación ligada a N; las secuencias de DP en negrita son sitios potenciales de escisión; las secuencias NX en negrita, en las que X puede ser S, T o G son sitios potenciales de desamidación; las secuencias DX en negrita, en las que X puede ser G, S, T o SDG son sitios potenciales de isomerización; las metioninas en negrita son sitios potenciales de oxidación de metionina; Q en negrita es un ácido piroglutámico N-terminal esperado.

La Figura 22 es un esquema que muestra el riesgo de inmunogenicidad reducido por formación de germinación. 24H4 (WT) contiene 5 aminoácidos no de la línea germinal dentro de las regiones marco, como se indica en el esquema.

Las Figuras 23A-23C muestran la optimización de Ab1. Se eligieron candidatos optimizados que se unen específicamente a la proMiostatina, lo que da como resultado docenas de clones con mayor afinidad. Se realizó FACS para mostrar el aumento de unión de los clones de levadura (Figura 23B) en comparación con Ab1 (Figura 23A). Figura 23C muestra que las variantes maduras por afinidad también tienen una tasa de desviación más lenta por octeto.

Las Figuras 24A-24B muestran alineaciones de secuencia de las regiones pesadas variables (Figura 24A) y regiones ligeras variables (Figura 24B) de Ab1 parental con variantes de afinidad optimizada, Ab3 y Ab5. Los identificadores de secuencia de arriba a abajo corresponden a las SEQ ID NO: 24, 26, 28 (Figura 24A). Los identificadores de secuencia de arriba a abajo corresponden a las SEQ ID NO: 30, 32, 34 (Figura 24B). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen utilizando la nomenclatura Kabat (subrayada) e IMGT (negrita). Las sustituciones del Ab1 parental se muestran en gris claro.

La Figura 25 muestra la expresión de miostatina pro y latente en músculo y plasma de ratones normales y atroficos.

La Figura 26 muestra la cuantificación de cambios en miostatina pro y latente en músculo y plasma. Las barras de izquierda a derecha muestran proMiostatina, miostatina latente, proMiostatina, miostatina latente y miostatina latente.

La Figura 27 muestra que Ab2 reconoce de forma única la proMiostatina y la miostatina latente, uniéndose a las formas principales de miostatina tanto en el suero como en el músculo. La transferencia Western no reductora para prodominio (gris más oscuro) y el factor de crecimiento maduro (gris más claro). La proMiostatina recombinante (rProMiostatina) muestra la migración de proMiostatina y prodominio de miostatina (miostatina latente) en el gel, resaltada por flechas. En suero, tanto Ab2 como AbMyo se unen a la miostatina latente (banda prodominio) y múltiples precursores parcialmente procesados, sin embargo, solo Ab2 reconoció la proMiostatina (banda superior). En el músculo, el Ab2 precipitó la proMiostatina, sin interacción de AbMyo con la proMiostatina en el tejido muscular.

Las Figuras 28A-28B proporcionan un modelo para el flujo de miostatina en músculos normales y atroficos. En el músculo normal (Figura 28A), la proMiostatina se produce en el músculo y se convierte en miostatina latente a través de la escisión por la proteasa Furina, que puede ocurrir dentro o fuera de la célula. Luego, una fracción de la miostatina latente en el músculo se libera a la circulación, formando una reserva circulante de miostatina latente. En la atrofia muscular (Figura 28B), un aumento en el factor de crecimiento de miostatina activo es causado por la regulación por incremento de los niveles de proMiostatina en el músculo y una conversión aumentada de miostatina latente en el factor de crecimiento activo. Como consecuencia, la miostatina latente circulante se reduce a medida que el conjunto muscular de miostatina latente se redirige hacia la formación de miostatina madura por escisión de mTLL2.

La Figura 29 muestra la detección de anticuerpos Ab2 (línea superior) y de control IgG (línea inferior) en suero de ratas dosificadas. Ab2 presenta niveles elevados en la circulación en comparación con el control de IgG, con un promedio de 17,1 mg/ml de Ab2 en suero al final del estudio. Niveles de Ab2 determinados por ELISA específico de IgG humana con cantidades conocidas de cada anticuerpo utilizado como patrón de referencia.

Las Figuras 30A-30B muestran efectos farmacodinámicos de Ab2 en ratas tratadas. La Figura 30A muestra que las ratas tratadas con Ab2 muestran una masa magra aumentada en comparación con los animales tratados con PBS o control de IgG. Se administraron por vía intravenosa Ab2 e IgG a dosis de 10 mg/kg el día 0. Masa magra medida por qNMR (N = 8 por grupo) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la dosificación. La Figura 30B muestra que los músculos recto femoral y tibialis anterior se recogieron de todos los grupos al final del estudio (N = 8 por grupo) y se pesaron para determinar la masa muscular. Las ratas tratadas con Ab2 muestran un aumento del 14% y del 11% en las masas de los músculos recto femoral y tibial anterior, respectivamente.

Las Figuras 31A-31B muestran niveles de miostatina pro/latente en ratas tratadas con Ab2. La Figura 31A muestra que el tratamiento con Ab2 (línea superior) aumenta los niveles de miostatina latente en suero de rata en ~ 20 veces. Figura 31B muestra que en el músculo de rata (recto femoral), el tratamiento con Ab2 conduce a un aumento de 1,9 veces la forma latente de miostatina. Las barras de izquierda a derecha corresponden a proMiostatina, miostatina latente, proMiostatina y miostatina latente. No se observa ningún cambio estadísticamente significativo en la proMiostatina en el músculo de rata. Estos datos provienen de análisis occidentales cuantitativos con n = 3 muestras por grupo.

La Figura 32 muestra que el tratamiento con Ab2 (Ab2) o con el anticuerpo comparador (AbMyo) conduce a un aumento de la masa magra en tan solo 7 días después de la dosificación del anticuerpo. Los aumentos en la masa magra son equivalentes para Ab2 y AbMyo hasta 21 días después de la dosificación. Sin embargo, a los 28 días después de la dosificación, los aumentos en la masa magra se pierden en el grupo tratado con AbMyo, mientras que los aumentos en el grupo tratado con Ab2 se mantienen durante la duración del estudio. La línea superior corresponde a Ab2, la línea media corresponde a AbMyo y la línea inferior corresponde a IgG Control (5 mg/kg).

La Figura 33 muestra que después de una dosis única de 5 mg/kg de Ab2 (línea superior) o de anticuerpo comparador (AbMyo; línea inferior), se midieron los niveles séricos de fármaco usando un ELISA anti-IgG humana. Fármaco se detecta en el suero tan pronto como 1 hora después de la dosificación, y los niveles >1 µg/ml de ambos anticuerpos se puede detectar durante todo el estudio. Sin embargo, Ab2 exhibe una vida media significativamente más larga y un área inferida bajo la curva (AUCINF) que AbMyo, lo que sugiere que, a dosis similares, Ab2 exhibe una exposición significativamente mayor que AbMyo.

La Figura 34 muestra que se midió la miostatina sérica en ratones tratados con fármaco y en controles usando transferencia de Western fluorescente. A pesar del aumento de la exposición en suero de Ab2, los niveles de miostatina latente en suero en ratones tratados con Ab2 y AbMyo fueron similares. Estos datos sugieren que los niveles circulantes de fármaco libre están suficientemente por encima del nivel de la diana como para que el aumento de la exposición sérica de Ab2 no conduzca a un aumento mayor en la miostatina latente circulante que el observado en el grupo AbMyo. Los grupos de datos de izquierda a derecha corresponden a IgG, Ab2, AbMyo, IgG, Ab2 y AbMyo.

Las Figuras 35A-35B muestran que se midieron niveles relativos de proMiostatina latente en lisados de músculo de ratón mediante transferencia de Western fluorescente. La Figura 35A muestra que la miostatina latente está elevada en los músculos tratados con Ab2 y AbMyo. Sin embargo, la elevación de la miostatina latente en los músculos tratados con AbMyo vuelve a la línea de base el día 28, mientras que los de los músculos tratados con Ab2 permanecen elevados hasta al menos este momento ( $P < 0,003$  frente al tratamiento con AbMyo). La Figura 35B muestra que se observa una tendencia similar con proMiostatina, aunque la diferencia entre los grupos tratados con Ab2 y AbMyo el día 28 no es estadísticamente significativa ( $P = 0,068$ ).

La Figura 36A muestra los efectos del tratamiento con Ab2 sobre la masa muscular y la función en ratones. Figura 36B muestra los efectos del tratamiento con Ab2 sobre la generación de fuerza máxima en ratones.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0067]** La miostatina es un miembro de la superfamilia TGF $\beta$  y pertenece a una subfamilia que incluye dos miembros: miostatina (también conocida como GDF8) y GDF11. Al igual que otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ , la miostatina y el GDF11 se expresan inicialmente como polipéptidos precursores inactivos (denominados proMiostatina y proGDF11, respectivamente). La estructura del dominio y la nomenclatura se muestran en la Figura 1A. La Figura 1B ilustra un modelo de dibujos animados de la estructura general de proMiostatina, donde el factor de crecimiento maduro se mantiene encerrado en una jaula compuesta por dos hélices alfa conectadas por un bucle denominado "lazo de latencia".

**[0068]** La activación y liberación del factor de crecimiento maduro se logra mediante varios eventos de escisión de proteasa discretos, descritos en la Figura 2. El primer paso de escisión de proMiostatina y proGDF11 se lleva a cabo mediante una proproteína convertasa, que corta en un sitio RXXR conservado entre el prodominio y el factor de crecimiento maduro. Esta escisión produce un complejo latente, en donde el prodominio protege al factor de crecimiento maduro para que no se una a sus receptores. La activación y liberación del factor de crecimiento de miostatina activo maduro se logra después de la escisión por una proteasa adicional de la familia BMP/toloide, tal como mTLL-2 (Figura 2).

**[0069]** Las secuencias ejemplares proGDF8 en el ser humano, rata, ratón y cynomolgus se proporcionan a continuación. En estas secuencias de proGDF8, un sitio de escisión de proproteína convertasa se indica en negrita y un sitio de proteasa toloide se indica subrayando. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende los residuos de aminoácidos 240 a 243 de las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de la proteasa toloide comprende los residuos de aminoácidos 74-75 de las SEQ ID NO: 52-55. Debe apreciarse que las secuencias de proGDF8 ejemplares proporcionadas en este documento no pretenden ser limitantes y secuencias de proGDF8 adicionales de otras especies, incluidas sus isoformas, están dentro del alcance de esta descripción.

proGDF8 (humano):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQ  
YDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITIMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYL  
RPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKA  
LDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD  
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPTHVLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIHYGKI  
PAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 52).

proGDF8 (rata):

NEDSEREANVEKEGLCNACAWRQNTSYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQ  
YDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGPKCCFFKFSSKIYQNKVVKAQLWIYL  
RAVKTPPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNLWKQPESNLGIEIKA  
LDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKTDTTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD  
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKI  
PAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 53).

proGDF8 (ratón):

NEGSEEREENVEKEGLCNACAWRQNTSYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQ  
YDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGPKCCFFKFSSKIYQNKVVKAQLWIYL  
RPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNLWKQPESNLGIEIKA  
LDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKTDTTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD  
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKI  
PAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 54).

proGDF8 (cynomolgus):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLKPAPPLRELIDQ  
YDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKCCFFKFSSKIYQNKVVKAQLWIYL  
RPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNLWKQPESNLGIEIKA  
LDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKTDTTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD  
WIIA (SEQ ID NO: 55).

**[0070]** La miostatina y GDF11 comparten un grado relativamente alto de conservación entre sus dominios de factores de crecimiento maduros, con un noventa por ciento de identidad, pero están mucho menos bien conservadas en sus regiones predominio con menos del cincuenta por ciento de identidad de aminoácidos entre los dos. La miostatina y el GDF11 se unen y envían señales a través de los mismos receptores que consisten en un receptor de tipo I (ALK4/5) en asociación con un receptor de tipo II (ACTRII/A/B). El compromiso de la miostatina con los receptores de tipo I y tipo II inicia una cascada de señalización que conduce a la fosforilación de SMAD y la activación transcripcional de los genes de atrofia muscular. El grado relativamente alto de conservación de los factores de crecimiento maduros ha dificultado la identificación de reactivos, como los anticuerpos monoclonales, que pueden diferenciar entre miostatina madura y GDF11.

**[0071]** En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina pro/latente se proporcionan en el presente documento que específicamente se unen a un constructo quimérico que contiene el dominio de factor de crecimiento y porción de propéptido terminal N de GDF-11 y la parte terminal C del propéptido de GDF8. Esta construcción quimérica, como se indica a continuación, se denomina GDF11Arm8.

> GDF11Arm8 (SEQ ID NO: 65)

MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLGDYKDDDDKHHHHHHLEVLFGQPAEGPAAAAAAAAAAAAAGVG  
GERSSRPAPSVAPEDGCPVCVWRQHSRELRLSISQILSKLRLEAPNISREVVKQLLKPAPPLRELI  
DQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKCCFFKFSSKIYQNKVVKAQLWI  
YLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNLWKQPESNLGIEI  
KALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKTDTTPKRSRRNLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFG  
WDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQII  
YGKIPGMVVDRCGCS

*Papel de miostatina en las miopatías*

**[0072]** El músculo esquelético suma aproximadamente el 40% de la masa corporal y es un órgano dinámico, girando a una velocidad de 1-2% por día. La atrofia muscular es un proceso catabólico altamente regulado que ocurre durante períodos de desuso (por ejemplo, atrofia por desuso) y/o en respuesta a una inflamación sistémica elevada (caquexia). En la atrofia por desuso, que puede ocurrir durante períodos prolongados de inmovilización, como durante el reposo en



cama, la pérdida de masa muscular se produce rápidamente. Por ejemplo, durante una estancia en el hospital de una semana, un paciente promedio pierde ~1,3 kg de masa muscular.

**[0073]** La atrofia muscular causa una morbilidad significativa en una amplia gama de condiciones clínicas. En enfermedades de denervación como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la atrofia muscular espinal (AME) y enfermedades genéticas, incluidas las distrofias musculares, la pérdida de fuerza y función muscular son manifestaciones clínicas altamente discapacitantes para las que no existen tratamientos adecuados. En los síndromes de caquexia debidos a insuficiencia renal, SIDA, afecciones cardíacas o cáncer, la atrofia muscular a menudo socava el tratamiento exitoso de la afección primaria. La pérdida de masa muscular también resulta como un proceso natural de envejecimiento y en su forma más severa se categoriza como sarcopenia, una condición generalizada entre los ancianos que se reconoce cada vez más como una patología que requiere intervención. Por último, el desuso es uno de los principales impulsores de la atrofia muscular. La inmovilización provoca una pérdida muscular rápida y significativa en un gran grupo de afecciones, como fractura de cadera, reemplazo electivo de articulaciones, lesión de la médula espinal, miopatía en cuidados críticos y accidente cerebrovascular. Si bien su causa es variada, estas indicaciones comparten una característica de debilidad muscular, que conduce a una discapacidad significativa, tiempos prolongados de rehabilitación física y recuperación y deterioro de la calidad de vida.

**[0074]** Ha habido una necesidad médica no satisfecha en condiciones de atrofia muscular. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporcionan aquí métodos para tratar la atrofia muscular. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento se refieren al tratamiento de una miopatía primaria. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento se refieren al tratamiento de la miopatía secundaria, como, por ejemplo, enfermedades de denervación, debilidad muscular genética y caquexia, afecciones en las que la pérdida muscular es secundaria a la patología de la enfermedad. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento para el tratamiento de miopatías primarias, tales como atrofia por desuso (por ejemplo, asociada con fractura de cadera o lesión de la médula espinal (LME)), dan como resultado un aumento de la masa muscular, fuerza y función en un sujeto.

#### *Inhibición de camino de miostatina*

**[0075]** Hay varios antagonistas de la vía de miostatina en diversas etapas de desarrollo clínico hacia el tratamiento de condiciones relacionadas con los músculos. Dichos antagonistas de la vía se dirigen al factor de crecimiento maduro o su receptor de tipo II, y la mayoría antagoniza la señalización de múltiples miembros de la familia de TGF $\beta$ . Por ejemplo, varios candidatos clínicos actuales bloquean factores de crecimiento adicionales como la activina A, GDF11 y las BMP 9 y 10, que son reguladores de la biología reproductiva, la cicatrización de heridas, la eritropoyesis y la formación de vasos sanguíneos, respectivamente. Los aspectos de esta divulgación se relacionan con el reconocimiento de que el bloqueo de estos factores además de la miostatina limitará potencialmente la población de pacientes que pueden someterse a una terapia de forma segura debido a efectos secundarios inaceptables.

**[0076]** Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos capaces de unirse a proMiostatina y/o miostatina latente, inhibiendo de ese modo la actividad de la miostatina y sus usos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la miopatía. En algunas realizaciones, dada la prevalencia del complejo latente en circulación, se proporcionan aquí tratamientos que se dirigen específicamente a precursores de miostatina más abundantes y de vida más larga, por ejemplo, proMiostatina y miostatina latente, en lugar del factor de crecimiento maduro. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los anticuerpos proporcionados en este documento pueden prevenir la activación proteolítica de proMiostatina y/o miostatina latente en miostatina madura que se considera la forma "activa" de miostatina, capaz de activar la vía de la miostatina, por ejemplo, mediante la unión de receptores Tipo I (ALK4/5) y Tipo II (ACTRII/A/B).

**[0077]** Como se usa en este documento, el término "miostatina pro/latente" se refiere a promiostatina, miostatina latente, o ambos. En algunas realizaciones, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se une específicamente a la proMiostatina. En algunas realizaciones, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se une específicamente a la miostatina latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se une específicamente tanto a la miostatina latente como a la proMiostatina. Debe apreciarse que "miostatina latente" y "proMiostatina" también pueden denominarse en el presente documento "GDF8 latente" y "proGDF8", respectivamente.

**[0078]** Tal como se utiliza aquí, el término "miostatina madura" se refiere a una forma madura, biológicamente activa de la miostatina. En algunas realizaciones, la miostatina madura es capaz de unirse y/o activarse al receptor de miostatina. La activación y liberación de miostatina madura *in vivo* a partir de su forma pro-miostatina se logra mediante varios eventos discretos de escisión de proteasas. Para empezar, la "pro-miostatina" es escindida por una proproteína convertasa, dando como resultado "miostatina latente", en la que la miostatina madura está protegida de la unión a sus receptores por una parte del prodominio. La activación y liberación de la miostatina madura se logra después de la escisión de la miostatina latente por una proteasa adicional de la familia BMP/toloide, como mTLL-2. Véanse, por ejemplo, las Figuras 1A, 1B y 2. Como se usa en este documento, el término "miostatina madura" puede referirse tanto a miostatina madura de longitud completa como a fragmentos de la miostatina madura de longitud completa que retienen actividad biológica. Las secuencias de miostatina madura ejemplares, sus variantes y los métodos para generar miostatina madura son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en el presente documento.

**[0079]** El término "pro-miostatina", también conocida como "proGDF8," se refiere a un precursor inactivo de la miostatina madura que comprende un homodímero unido por disulfuro, cada molécula del homodímero que comprende el amino prodominio de terminal unido covalentemente al dominio de miostatina madura terminal de carboxilo. En una realización, la "pro-miostatina" no ha sido escindida ni por una proproteína convertasa ni por una proteasa de la familia BMP/toloide. Se conocen bien en la técnica secuencias ejemplares de pro-miostatina, variantes de las mismas y métodos para generar pro-miostatina y se describen con más detalle en el presente documento.

**[0080]** Tal como se utiliza aquí, el término "miostatina latente" se refiere a un precursor inactivo de la miostatina madura que comprende un homodímero unido por disulfuro, comprendiendo cada molécula del homodímero el prodominio terminal amino no covalentemente unido al dominio de miostatina madura terminal de carboxilo. En una realización, la "miostatina latente" se genera a partir de una pro-miostatina que ha sido escindida por una proproteína convertasa, pero que no ha sido escindida por una proteasa de la familia BMP/toloide. En otra realización, se puede generar "miostatina latente" combinando el prodominio y el dominio de miostatina madura carboxi terminal in vitro y permitiendo que se plieguen correctamente. Véase, por ejemplo, Sengle et al., J. Biol. Chem., 286 (7): 5087-5099, 2011. Las secuencias de miostatina latente ejemplares, sus variantes y los métodos para generar miostatina latente son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en el presente documento.

**[0081]** Como se usa en este documento, el término "miostatina pro/latente" se refiere a pro-miostatina, miostatina latente, o tanto pro-miostatina como miostatina latente. En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a la pro-miostatina. En otra forma de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a la miostatina latente. En otra realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a pro-miostatina y miostatina latente.

**[0082]** Como se usa en este documento, el término "pro-miostatina pura" o "pro-GDF8 puro" se refiere a una composición que comprende promiostatina que está libre, o sustancialmente libre, de otras formas de miostatina, tales como miostatina latente y miostatina madura. En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a la pro-miostatina pura. En otras palabras, dicho anticuerpo se une a la pro-miostatina en una composición que carece de las otras formas de miostatina, miostatina latente y miostatina madura.

**[0083]** Como se usa en este documento, el término "sitio de escisión de proproteína convertasa" se refiere a un sitio en el que pro-miostatina se escinde por una proproteína convertasa. En una realización, un sitio de escisión de proproteína convertasa es un sitio RXXR conservado entre el prodominio y el dominio biológicamente activo, o miostatina madura. Véase, por ejemplo, las Figuras 1A, 1B y 2.

**[0084]** Como se usa en este documento, el término "sitio de escisión de la familia de la proteasa BMP/toloide" se refiere a un sitio donde la miostatina latente se escinde por un miembro de la familia de la proteasa BMP/toloide. En una realización, un miembro de la familia de proteasas BMP/toloide es mTLL- 2. Ver, por ejemplo, las Figuras 1A, 1B y 2.

#### *Anticuerpos que se unen a la miostatina pro/latente*

**[0085]** La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que ciertos anticuerpos específicos de la miostatina pro/latente (por ejemplo, un anticuerpo al que se hace referencia en el presente documento como Ab1), impidieron la activación proteolítica de la miostatina pro/latente en miostatina madura. Además, la inhibición de la activación de la miostatina usando tales anticuerpos fue eficaz para aumentar la masa muscular tanto en modelos de ratón con atrofia muscular inducida por dexametasona como por yeso. Los aspectos de la divulgación proporcionan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) que se unen a la miostatina pro/latente e inhiben la activación proteolítica de la miostatina pro/latente en miostatina madura.

**[0086]** Un anticuerpo (usado de manera intercambiable en la forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través del sitio de reconocimiento de al menos un antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos (por ejemplo, de longitud completa), sino también fragmentos de unión a antígeno de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), monocatenarios (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, que incluye variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, como IgD, IgE, IgG, IgA o IgM (o una subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

- 5 **[0087]** Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a miostatina pro/latente está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de la miostatina pro/latente). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a miostatina pro/latente puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de miostatina pro/latente de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.
- 10 **[0088]** El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana y fragmentos de las mismas. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, en secuencias marco humanas.
- 15 **[0089]** El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse a una inmunoglobulina o específico del receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.
- 20 **[0090]** Los anticuerpos aquí descritos son capaces de unirse a una miostatina pro/latente, inhibiendo de este modo la activación proteolítica de miostatina pro/latente en miostatina madura. En algunos casos, los anticuerpos descritos en este documento pueden inhibir la activación proteolítica de miostatina pro/latente en al menos un 20%, por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o superior. En algunos casos, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden inhibir la escisión proteolítica de la proMiostatina por una proproteína convertasa (p. ej., furina) en al menos un 20%, p. ej., 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En algunos casos, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden inhibir la escisión proteolítica de proMiostatina o miostatina latente por una proteasa toloide (p. ej., MTLL2) en al menos un 20%, p. ej., 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. La actividad inhibidora de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente puede medirse mediante métodos de rutina, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1 y la Figura 3. Sin embargo, debe apreciarse que pueden usarse métodos adicionales para medir la actividad inhibidora de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente sobre la escisión proteolítica de la miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, la inhibición de la escisión de la miostatina pro/latente (por ejemplo, por una proproteína convertasa y/o proteasa toloide) puede reflejarse como una constante de inhibición (K<sub>i</sub>), que proporciona una medida de la potencia del inhibidor, y cuál es la concentración del inhibidor (por ejemplo, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente) requerido para reducir la actividad de proteasa (por ejemplo, de una proproteína convertasa o proteasa toloide) a la mitad y no depende de las concentraciones de enzima o sustrato.
- 30 **[0091]** En algunas realizaciones, una proproteína convertasa comprende (i) un dominio catalítico que hidroliza un enlace peptídico de una proteína que contiene un sitio de escisión de proproteína convertasa, y (ii) un bolsillo de unión que se une a un rTGF con un sitio de escisión de proproteína convertasa. Ejemplos de convertasas de proproteína para uso de acuerdo con la presente divulgación incluyen, sin limitación, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3 (por ejemplo, furina). Una proproteína convertasa, en algunas realizaciones, se obtiene de cualquier mamífero, incluidos, sin limitación, seres humanos, monos o roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres).
- 35 **[0092]** En algunas realizaciones, una proproteína convertasa es homóloga a una proproteína convertasa seleccionada de entre el grupo constituido por: PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3 (por ejemplo, la furina). Por ejemplo, una proproteína convertasa puede ser al menos 70% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, al menos 99,5% idéntica, o al menos aproximadamente 99,9% idéntica a PCSK5/6, PACE4, PACE7 o PACE3 (por ejemplo, furina).
- 40 **[0093]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).
- 45 **[0094]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).
- 50 **[0095]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).
- 55 **[0096]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).
- 60 **[0097]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).
- 65 **[0098]** Un sitio de escisión de proproteína convertasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por una proproteína convertasa (por ejemplo, PCSK5/6, PACE4, PACE7 y PACE3). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X-X-R, donde R es arginina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos R-X(K/R)-R, donde R es arginina, K es lisina y X es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende que la secuencia de aminoácidos es R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), donde R es arginina y V es valina. Los sitios de escisión de la proproteína convertasa ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cynomolgus se muestran, en negrita, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proproteína convertasa comprende la secuencia de aminoácidos RSRR (SEQ ID NO: 56).

- 5 **[0094]** En algunas realizaciones, las proteasas de Toloide para uso de acuerdo con la presente descripción incluyen, sin limitación, BMP-1, mTLL-1 y mTLL-2. Puede obtenerse una proteasa toloide de cualquier mamífero, incluidos, sin limitación, seres humanos, monos o roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres). En algunas realizaciones, una proteasa toloide es homóloga a una proteasa toloide seleccionada del grupo que consiste en: BMP-1, mTLL-1 y mTLL-2. Por ejemplo, una proteasa toloide puede ser al menos 70% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, al menos 99,5% idéntica, o al menos aproximadamente 99,9% idéntica a BMP-1, mTLL-1 y mTLL-2.
- 10 **[0095]** Un sitio de escisión de toloide proteasa, en algunas realizaciones, es una secuencia de amino que puede escindirse por un toloide (por ejemplo, BMP-1, mTLL-1 y mTLL-2). Los sitios de escisión de la proteasa toloide ejemplares para miostatina humana, de rata, de ratón y de cinomolgus se muestran, subrayados, en las SEQ ID NO: 52-55. En algunas realizaciones, el sitio de escisión toloide comprende la secuencia de aminoácidos QR, donde Q es glutamina y R es arginina.
- 15 **[0096]** En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en este documento son capaces de unirse a una miostatina pro/latente, por lo tanto la inhibición de la actividad de miostatina. En algunos casos, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden inhibir la señalización de miostatina en al menos un 20%, por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En algunas realizaciones, la inhibición de la señalización de miostatina puede medirse mediante métodos de rutina, por ejemplo, usando un ensayo de activación de miostatina como se describe en el Ejemplo 1. Sin embargo, debe apreciarse que se pueden usar métodos adicionales para medir la actividad de señalización de miostatina.
- 20 **[0097]** Se debe apreciar que la extensión de la escisión proteolítica de la miostatina, por ejemplo, mediante una proproteína convertasa y/o una proteasa toloide, se puede medir y/o cuantificarse usando cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, el grado de escisión proteolítica de la miostatina se mide y/o cuantifica usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Por ejemplo, se puede usar un ELISA para medir el nivel de factor de crecimiento liberado (por ejemplo, miostatina madura). Como otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a proMiostatina, miostatina latente y/o miostatina madura se puede usar en un ELISA para medir el nivel de una forma específica de miostatina (p. ej., miostatina pro/latente/madura), para cuantificar la grado de escisión proteolítica de la miostatina. En algunas realizaciones, el grado de escisión proteolítica de la miostatina se mide y/o cuantifica usando inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE o espectrometría de masas de péptidos tripticos, técnicas basadas en anisotropía de fluorescencia, ensayos FRET, espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio y/o espectroscopia de RMN.
- 25 **[0098]** En algunas realizaciones, los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En los anticuerpos se pueden encontrar dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda y kappa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de ellas pueden dividirse en subclases (isotipos), p. ej., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Cada cadena ligera incluye típicamente un dominio variable (V) N-terminal (V<sub>L</sub>) y un dominio constante (C) (C<sub>L</sub>). Cada cadena pesada incluye típicamente un dominio V N-terminal (V<sub>H</sub>), tres o cuatro dominios C (C<sub>H</sub>1-3) y una región bisagra. El dominio CH más próximo a V<sub>H</sub> se designa como C<sub>H</sub>1. Los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas llamadas regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un soporte para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR de la cadena pesada se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que los constituyentes de CDR de la cadena ligera se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Las CDR se refieren típicamente a las CDR de Kabat, como se describe en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (1991), eds. Kabat y col. Otro estándar para caracterizar el sitio de unión al antígeno es hacer referencia a los bucles hipervariables como los describe Chothia. Véase, por ejemplo, Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Otro estándar más es la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a las CDR de Kabat se pueden implementar alternativamente usando relaciones descritas similares con respecto a los bucles hipervariables de Chothia o los bucles definidos por AbM, o combinaciones de cualquiera de estos métodos.
- 30 **[0099]** En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente de la presente descripción y de las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción que codifican los anticuerpos incluyen la secuencias de aminoácidos CDR mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1.

Anticuerpo	CDRH1 (SEQ ID NO: 1-3)	CDRH2 (SEQ ID NO: 4-9)	CDRH3 (SEQ ID NO: 10-11)	CDRL1 (SEQ ID NO: 12-17)	CDRL2 (SEQ ID NO: 18-21)	CDRL3 (SEQ ID NO: 22-23)
Ab1 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLEWSH YVGMDV (SEQ ID NO: 10)	SGSSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRP (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDSLNGV (SEQ ID NO: 22)
Ab3 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFASFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSNKYYA DSVKG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSN (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLEWSH KVGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRP (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)
Ab5 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFASFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 8) ISYDGSN (SEQ ID NO: 9)	DLLVRFLEWSH KVGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 16) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 17)	SDDQRP (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)

**[0100]** En la Tabla 1, las secuencias individuales de CDRH3 y CDRL3 reflejan Kabat y IMGT.

**[0101]** En algunas realizaciones, los agentes de unión miostatina anti-pro/latente (por ejemplo, anticuerpos) de la divulgación incluyen cualquier anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) que incluye un CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, o CDRL3, o combinaciones de los mismos, como se proporciona para cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, los agentes de unión miostatina anti-pro/latente incluyen CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1. La divulgación también incluye cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una molécula que comprenda una CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3, según se proporciona para cualquiera de los anticuerpos que se muestran en la Tabla 1. Los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpos pueden reproducir un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Por consiguiente, los agentes de unión de miostatina anti-pro/latente de la descripción, o las moléculas de ácido nucleico de los mismos, pueden incluir al menos la cadena pesada y/o cadena ligera CDR3 de los anticuerpos como se muestra en la Tabla 1.

**[0102]** Los aspectos de la divulgación se refieren a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno, que se une a la proteína miostatina pro/latente y que comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

**[0103]** En algunas realizaciones, CDRH1 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, CDRH2 comprende una secuencia tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9. En algunas realizaciones, CDRH3 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 10-11. CDRL1 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 12-17. En algunas realizaciones, CDRL2 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 18-21. En algunas realizaciones, CDRL3 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 22-23.

**[0104]** En algunas realizaciones (por ejemplo, como para anticuerpo Ab1 miostatina anti-pro/latente, que se muestra en la Tabla 1), CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 2, CDRH2 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 4 o 5, CDRH3 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 10, CDRL1 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 12, o 13, CDRL2 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 18 o 19, y CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 22, y el anticuerpo se une a la miostatina pro/latente.

**[0105]** En algunas realizaciones (por ejemplo, como para anticuerpo Ab3 de miostatina anti-pro/latente, que se muestra en la Tabla 1), CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 6 o 7, CDRH3 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 11, CDRL1 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 14, o 15, CDRL2 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 20 o 21, y CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 23, y el anticuerpo se une a la miostatina pro/latente.

**[0106]** En algunas realizaciones (por ejemplo, como para el anticuerpo Ab5 miostatina anti-pro/latente, que se muestra en la Tabla 1), CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO:1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 8 o 9, CDRH3 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 11, CDRL1 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 16, o 17, CDRL2 comprende una secuencia como se indica en SEQ ID NO: 20 o 21, y CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 23, y el anticuerpo se une a la miostatina pro/latente. En algunos ejemplos, cualquiera de los agentes de unión miostatina anti-pro/latente (p. ej., anticuerpos) de la divulgación incluye cualquier anticuerpo (incluidos fragmentos de unión a antígeno) que tenga una o más secuencias de CDR (p. ej., CDRH o CDRL) sustancialmente similares a CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y/o CDRL3. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una o más secuencias de CDR como se muestra en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 1-23) que contienen hasta 5, 4, 3, 2 o 1 variaciones de residuos de aminoácidos en comparación con la región de CDR correspondiente en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23. Las secuencias completas de aminoácidos y ácidos nucleicos para la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos enumerados en la Tabla 1 se proporcionan a continuación.

Región variable de cadena pesada - Ab1 parental

QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID  
NO: 24)

## ES 2 881 642 T3

5 CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG  
TGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG  
GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAA  
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTC  
10 GCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
38)

Región variable de cadena pesada - Línea germinal Ab2

15 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK  
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLW SHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ  
ID NO: 25)

20 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG  
25 GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGA  
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGT  
30 CGCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
39)

Región variable de cadena pesada - Ab3 parental

35 QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLW SHKYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID  
NO: 26)

40 CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG  
TGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG  
45 GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGAA  
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTC

50 GCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
40)

55

## ES 2 881 642 T3

### Región variable de cadena pesada - Línea germinal Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM DVWGQGT TTVTVSS (SEQ ID  
NO: 27)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG  
GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGA  
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGT  
CGCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
41)

### Región variable de cadena pesada - Ab5 parental

QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNNKYYADSVK  
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM DVWGQGT TTVTVSS (SEQ  
ID NO: 28)

CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG  
TGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG  
GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAA  
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTC  
GCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
42)

### Variable de cadena pesada región - línea germinal Ab6

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNNKYYADSVK  
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM DVWGQGT TTVTVSS (SEQ  
ID NO: 29)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG  
GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGA  
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGT  
CGCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:  
43)



## ES 2 881 642 T3

### Región variable de cadena ligera - Ab1 parental

QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)

5

10

15

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
GCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG  
CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATT  
ATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT  
CCTA (SEQ ID NO: 44)

### Región variable de cadena ligera - línea germinal Ab2

20

25

30

35

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
GCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG  
CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATT  
ATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT  
CCTA (SEQ ID NO: 45)

### Región variable de cadena ligera - Ab3 parental

40

45

50

QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
CCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCT  
CCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTAT  
TACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC  
TA (SEQ ID NO: 46)

### Región variable de cadena ligera - Ab4 línea germinal

55

60

65

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
CCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCT  
CCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTAT  
TACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC  
TA (SEQ ID NO: 47)

Región variable de cadena ligera - Ab5 parental

QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSPVDRFSGSKSG  
TSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
GCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG  
CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATT  
ATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT  
CCTA (SEQ ID NO: 48)

Región variable de cadena ligera - línea germinal Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSPVDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTG  
TTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACG  
GCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG  
CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATT  
ATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT  
CCTA (SEQ ID NO: 49)

Cadena pesada Ab2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK  
GRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTK  
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
SSLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 50)

Cadena ligera Ab2

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSPVDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV  
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS  
TVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 51)

**[0107]** En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente de la divulgación incluyen cualquier anticuerpo que incluye un dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 24-29 o un dominio variable de cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID NO: 30-35. En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente de la divulgación incluyen cualquier anticuerpo que incluya los pares variables de cadena pesada y variables de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 y 30; 25 y 31; 26 y 32; 27 y 33; 28 y 34; o 29 y 35).

**[0108]** Los aspectos de la divulgación proporcionan anticuerpos de miostatina anti-pro/latente que tienen una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada y/o variable de cadena ligera homóloga a cualquiera de los descritos en este documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo de miostatina anti-pro/latente comprende una secuencia variable de cadena pesada o una secuencia variable de cadena ligera que es al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%,

98% o 99%) idéntica a la secuencia variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 24-29 o una secuencia variable de cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID NO: 30-35. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos variable de cadena pesada homóloga y/o variable de cadena ligera no varían dentro de ninguna de las secuencias de CDR proporcionadas en este documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el grado de variación de secuencia (por ejemplo, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) puede ocurrir dentro de una secuencia variable de cadena pesada y/o una cadena ligera que excluye cualquiera de las secuencias de CDR proporcionadas en este documento.

**[0109]** El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87: 2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90: 5873-77, 1993. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de interés. Cuando existen espacios entre dos secuencias, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

**[0110]** En algunas realizaciones, las mutaciones conservadoras se pueden introducir en las CDR o secuencias de marco en posiciones en las que los residuos no son propensos a estar involucrados en la interacción con miostatina pro/latente tal como se determina basado en la estructura cristalina. Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las variantes se pueden preparar de acuerdo con métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidos por un experto en la técnica, como los que se encuentran en las referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

**[0111]** En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria comprenden mutaciones que confieren propiedades deseables a los anticuerpos. Por ejemplo, para evitar complicaciones potenciales debido al intercambio de Fab-brazo, que se sabe que ocurre con mAb IgG4 nativos, los anticuerpos proporcionados en este documento pueden comprender una mutación estabilizadora 'Adair' (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), donde la serina 228 (numeración UE; residuo 241 numeración Kabat) se convierte en prolina dando como resultado una secuencia de bisagra similar a IgG1 (CPPCP (SEQ ID NO: 58)). Por consiguiente, cualquiera de los anticuerpos puede incluir una mutación estabilizadora de 'Adair' o la secuencia de aminoácidos CPPCP (SEQ ID NO: 58).

**[0112]** Los agentes de unión miostatina anti-pro/latente de esta divulgación pueden comprender opcionalmente regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio V<sub>L</sub> puede estar unido en su extremo C-terminal a un dominio constante de cadena ligera como C<sub>k</sub> o C<sub>λ</sub>. De manera similar, un dominio V<sub>H</sub> o parte del mismo puede unirse a toda o parte de una cadena pesada como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y cualquier subclase de isotipo. Los anticuerpos pueden incluir regiones constantes adecuadas (véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, N° 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Por lo tanto, los anticuerpos dentro del alcance de esta divulgación pueden incluir dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, o una porción de unión a antígeno de los mismos, combinados con cualquier región constante adecuada.

**[0113]** En ciertas realizaciones, la V<sub>H</sub> y/o dominios V<sub>L</sub> puede ser revertido a secuencia de línea germinal, por ejemplo, la FR de estos dominios se mutan usando técnicas de biología molecular convencionales para que coincida con los producidos por las células de la línea germinal. Por ejemplo, los dominios V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> pueden revertirse a la secuencia de la línea germinal de IgHV3-30 (SEQ ID NO: 36) y/o IgLV1-44 (SEQ ID NO: 37), respectivamente. Debe apreciarse que cualquiera de los dominios V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> puede revertirse a cualquier secuencia de línea germinal adecuada. En otras realizaciones, las secuencias de FR permanecen divergentes de las secuencias de la línea germinal consenso.

IgHV3-30

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK  
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 36)

IgLV1-44

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSG  
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG (SEQ ID NO: 37)

**[0114]** En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente o fragmentos de unión a antígeno pueden o no incluir la región de entramado de los anticuerpos que se muestran en SEQ ID NOs: 24-35. En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina anti-pro-latente son anticuerpos murinos e incluyen secuencias de la región marco murina.

**[0115]** En algunas realizaciones, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente de la divulgación puede unirse a miostatina pro/latente con afinidad relativamente alta, por ejemplo, con un Kd de menos de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M o menos. Por ejemplo, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente pueden unirse a miostatina pro/latente con una afinidad entre 5 pM y 500 nM, por ejemplo, entre 50 pM y 100 nM, por ejemplo, entre 500 pM y 50 nM. La divulgación también incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que compiten con cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento por unirse a la miostatina pro/latente y que tienen una afinidad de 50 nM o menos (*p. ej.*, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 500 pM o menos, 50 pM o menos, o 5 pM o menos). La afinidad y la cinética de unión del anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se pueden probar usando cualquier método adecuado que incluye, pero no se limita a tecnología de biosensores (por ejemplo, OCTET o BIACORE).

**[0116]** Un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno diana, se une al antígeno diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que se une a antígenos no diana. En algunas realizaciones, se describen en el presente documento anticuerpos que se unen específicamente a miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une en o cerca de un sitio de escisión toloide o en o cerca de un sitio de acoplamiento toloide de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une cerca de un sitio de escisión de toloide o cerca de un sitio de acoplamiento de toloide si se une dentro de 15 o menos residuos de aminoácidos del sitio de escisión de toloide o sitio de acoplamiento de toloide. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos de un sitio de escisión toloide o sitio de acoplamiento toloide. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une en o cerca de un sitio de escisión toloide de GDF8. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 62 PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT (SEQ ID NO: 62). En otras realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une en o cerca de un sitio de escisión de proproteína convertasa o en o cerca de un sitio de acoplamiento de proproteína convertasa de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une cerca de un sitio de corte de proproteína convertasa o cerca de un sitio de acoplamiento de proproteína convertasa si se une dentro de 15 o menos residuos de aminoácidos del sitio de corte de proproteína convertasa o sitio de acoplamiento de proproteína convertasa. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos de un sitio de escisión de proproteína convertasa o sitio de acoplamiento de proproteína convertasa. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une en o cerca de un sitio de escisión de proproteína convertasa de GDF8. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 63. GLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRC (SEQ ID NO: 63).

**[0117]** En un ejemplo, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente descritos en este documento específicamente se unen a miostatina pro/latente en comparación con otras formas de miostatina y/o otros miembros de la familia TGF $\beta$  de factores de crecimiento. Los miembros de la familia de factores de crecimiento TGF $\beta$  incluyen, entre otros, proteína AMH, ARTN, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, GDF1, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDNF, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, LEFTY1, LEFTY2, NODAL, NRTN, PSPN, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. Dichos anticuerpos pueden unirse a miostatina pro/latente con una afinidad mucho mayor en comparación con otros miembros de la familia de factores de crecimiento TGF $\beta$  (*p. ej.*, Al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces más). En algunas realizaciones, tales anticuerpos pueden unirse a la miostatina pro/latente con una afinidad de al menos 1.000 más en comparación con otros miembros de la familia de factores de crecimiento TGF $\beta$ . En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento pueden unirse a miostatina pro/latente con una afinidad mucho mayor en comparación con una o más formas de GDF11 o miostatina madura (*p. ej.*, al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100, 200, 500 o 1000 veces más). En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento pueden unirse a miostatina pro/latente con una afinidad de al menos 1000 más en comparación con una o más formas de GDF11 (*p. ej.*, ProGDF11, GDF11 latente o GDF11 maduro) o miostatina madura. Alternativamente, o además, los anticuerpos pueden exhibir una actividad inhibidora mucho mayor contra la escisión proteolítica de la miostatina pro/latente (*p. ej.*, por una proproteína convertasa o proteasa toloide) en comparación con otros miembros de la familia TGF $\beta$ , como el GDF11 pro/latente (*p. ej.*, en al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces más alto).

**[0118]** En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a un antígeno pero no pueden eliminar eficazmente el antígeno del plasma. Por tanto, en algunas realizaciones, la concentración del antígeno en el plasma puede incrementarse reduciendo el aclaramiento del antígeno. Sin embargo, en algunas realizaciones, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de barrido) proporcionados en este documento tienen afinidad por un antígeno que es sensible al pH. Dichos anticuerpos sensibles al pH pueden unirse al antígeno en plasma a pH neutro y disociarse del antígeno en un endosoma ácido, reduciendo así la acumulación de antígeno mediada por anticuerpos y/o promoviendo la eliminación de antígeno del plasma.

**[0119]** Los aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos de barrido. Como se usa en el presente documento, "anticuerpos de barrido" se refiere a anticuerpos que tienen unión de antígeno sensible al pH y al menos un nivel umbral de unión al receptor de Fc neonatal de la superficie celular (FcRn) a pH neutro o fisiológico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido se unen al receptor Fc neonatal FcRn a pH neutro. Por ejemplo, los anticuerpos de barrido pueden unirse al FcRn a un pH que varía de 7,0 a 7,6. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido pueden unirse a un antígeno en un sitio de unión de antígeno y unirse a un FcRn celular a través de una porción Fc del anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido pueden internalizarse, liberando antígeno en un endosoma ácido, que puede degradarse. En algunas realizaciones, un anticuerpo de barrido, que ya no está unido al antígeno, puede luego ser liberado (por ejemplo, por exocitosis) por la célula de vuelta al suero.

**[0120]** En algunas realizaciones, FcRn en el endotelio vascular (por ejemplo, de un sujeto) se extiende la vida media de un barrido de anticuerpos. En algunas realizaciones, las células endoteliales vasculares internalizan anticuerpos de barrido, que en algunas realizaciones se unen a un antígeno tal como miostatina (por ejemplo, proMiostatina, miostatina latente o miostatina cebada). En algunas realizaciones, un anticuerpo de barrido se recicla de nuevo al torrente sanguíneo. En algunas realizaciones, un anticuerpo de barrido tiene una vida media aumentada (por ejemplo, en el suero de un sujeto) en comparación con su contraparte convencional. En algunas realizaciones, una contraparte convencional de un anticuerpo de barrido se refiere al anticuerpo del que se derivó el anticuerpo de barrido (por ejemplo, antes de manipular la parte Fc del anticuerpo convencional para que se una a FcRn con mayor afinidad a pH 7). En algunas realizaciones, un anticuerpo de barrido tiene una vida media en el suero de un sujeto que es al menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200% o 250% más en comparación con su contraparte convencional.

**[0121]** En algunas realizaciones, una porción Fc de un anticuerpo de barrido se une a FcRn. En algunas realizaciones, la porción Fc de un anticuerpo de barrido se une a FcRn a un pH de 7,4 con una  $K_d$  que varía de  $10^{-3}$  M a  $10^{-8}$  M. En algunas realizaciones, un anticuerpo de barrido se une a FcRn a un pH de 7,4 con un  $K_d$  que varía de  $10^{-3}$  M a  $10^{-7}$  M, de  $10^{-3}$  M a  $10^{-6}$  M, de  $10^{-3}$  M a  $10^{-5}$  M, de  $10^{-3}$  M a  $10^{-4}$  M, de  $10^{-4}$  M a  $10^{-8}$  M, de  $10^{-4}$  M a  $10^{-7}$  M, de  $10^{-4}$  M a  $10^{-6}$  M, de  $10^{-4}$  M a  $10^{-5}$  M, de  $10^{-5}$  M a  $10^{-8}$  M, de  $10^{-5}$  M a  $10^{-7}$  M, de  $10^{-5}$  M a  $10^{-6}$  M, de  $10^{-6}$  M a  $10^{-8}$  M, de  $10^{-6}$  M a  $10^{-7}$  M, o de  $10^{-7}$  M a  $10^{-8}$  M. En algunas realizaciones, FcRn se une a la región de bisagra CH2-CH3 de un anticuerpo de barrido. En algunas realizaciones, FcRn se une a la misma región que la proteína A o la proteína G. En algunas realizaciones, FcRn se une a un sitio de unión diferente de los FcγR. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos AA de una región Fc de anticuerpo de barrido son necesarios para unirse a FcRn. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos AA de una región Fc de anticuerpo de barrido afectan la unión a FcRn.

**[0122]** En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento están diseñados para bind FcRn con mayor afinidad. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente se modifica por ingeniería genética para unirse a FcRn con mayor afinidad a pH 7,4. En algunas realizaciones, la afinidad de los anticuerpos de barrido por FcRn aumenta para extender sus propiedades farmacocinéticas (PK) en comparación con sus contrapartes convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido provocan menos reacciones adversas debido a su eficacia a dosis más bajas. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido se administran con menos frecuencia. En algunas realizaciones, aumenta la transcitosis de anticuerpos de barrido contra ciertos tipos de tejido. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido mejoran la eficacia del suministro transplacentario. En algunas realizaciones, la producción de anticuerpos de barrido es menos costosa.

**[0123]** En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento están diseñados para unir FcRn con menor afinidad. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento está diseñado para unirse a FcRn con menor afinidad a pH 7,4. En algunas realizaciones, la afinidad de los anticuerpos de barrido por FcRn disminuye para acortar sus propiedades farmacocinéticas (PK) en comparación con sus contrapartes convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido se eliminan más rápidamente para la formación de imágenes y/o radioinmunoterapia. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido promueven la eliminación de anticuerpos patógenos endógenos como tratamiento para enfermedades autoinmunes. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido reducen el riesgo de un resultado adverso del embarazo, que puede ser causado por el transporte transplacentario de material de anticuerpos específicos del feto.

**[0124]** En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido han disminuido afinidad a un antígeno a pH bajo, en comparación con un pH neutro o fisiológico (por ejemplo, pH 7,4). En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido tienen una afinidad disminuida por un antígeno a un pH ácido (por ejemplo, un pH que varía de 5,5 a 6,5) en comparación con un pH fisiológico (por ejemplo, pH 7,4). Debe apreciarse que cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento puede diseñarse para disociarse del antígeno dependiendo de los cambios en el pH (por ejemplo, anticuerpos sensibles al pH). En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido proporcionados en el presente documento están diseñados para unirse al antígeno dependiente del pH. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido proporcionados en el presente documento se diseñan para unirse a FcRn en función del pH. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido proporcionados en este documento se internalizan mediante endocitosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido proporcionados aquí se internalizan mediante la unión de FcRn. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido endocitosados liberan antígeno en un endosoma. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido se reciclan de nuevo a la superficie celular. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido permanecen unidos a las células. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido endocitosados se reciclan de nuevo al plasma. Debe apreciarse que la porción Fc de cualquiera de los anticuerpos

proporcionados en el presente documento puede diseñarse para que tenga una actividad de unión a FcRn diferente. En algunas realizaciones, la actividad de unión de FcRn afecta el tiempo de eliminación de un antígeno por un anticuerpo de barrido. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido pueden ser anticuerpos de barrido de acción prolongada o rápida.

**[0125]** En algunas realizaciones, la conversión de un anticuerpo terapéutico convencional en un anticuerpo de barrido reduce la dosis eficaz. En algunas realizaciones, la conversión de un anticuerpo terapéutico convencional en un anticuerpo de barrido reduce la dosis eficaz en al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%. En algunas realizaciones, la conversión de un anticuerpo terapéutico convencional en un anticuerpo de barrido reduce la dosis eficaz en al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces.

**[0126]** En algunas realizaciones, la selección de una dosis apropiada de un anticuerpo de barrido para la terapia puede realizarse empíricamente. En algunas realizaciones, una dosis alta de un anticuerpo de barrido puede saturar FcRn, dando como resultado anticuerpos que estabilizan el antígeno en suero sin internalizarse. En algunas realizaciones, una dosis baja de un anticuerpo de barrido puede no ser terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, los anticuerpos de barrido se administran una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 10 semanas, una vez cada 12 semanas, una vez cada 16 semanas, una vez cada 20 semanas o una vez cada 24 semanas.

**[0127]** En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento pueden ser modificados o diseñados para ser barrido de anticuerpos. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se puede convertir en un anticuerpo de barrido usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, se han descrito previamente métodos adecuados para fabricar anticuerpos de barrido en Igawa et al., (2013) "Engineered Monoclonal Antibody with Novel Antigen-Sweeping Activity In Vivo", PLoS ONE 8 (5): e63236; e Igawa et al., "pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality", Biochimica et Biophysica Acta 1844 (2014) 1943-1950; el contenido de cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia. Debe apreciarse, sin embargo, que los métodos para producir anticuerpos de barrido como se proporcionan en el presente documento no pretenden ser limitantes. Por tanto, los métodos adicionales para producir anticuerpos de barrido están dentro del alcance de esta descripción.

**[0128]** Algunos aspectos de la divulgación se basan en el reconocimiento de que la afinidad (p. ej., expresada como Kd) de cualquiera de los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente proporcionados en este documento son sensibles a los cambios de pH. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento tienen un aumento de Kd de unión a miostatina pro/latente a un pH relativamente bajo (p. ej., un pH que varía de 4,0 a 6,5) en comparación con un pH relativamente alto (p. ej., un pH que varía de 7,0-7,4). En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento tienen una Kd de unión a miostatina pro/latente que varía de  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M cuando el pH está entre 4,0 y 6,5. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento tienen una Kd de unión a miostatina pro/latente que varía de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M cuando el pH está entre 7,0 y 7,4. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en este documento tienen una Kd de unión a la miostatina pro/latente que es al menos 2 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces, al menos 5000 veces, o al menos 10000 veces mayor a un pH entre 4,0 y 6,5 en comparación con un pH entre 7,0 y 7,4.

**[0129]** En algunas realizaciones, los anticuerpos miostatina pro/latente se proporcionan en el presente documento que no se unen específicamente a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácido expuesta como (SEQ ID NO: 64). En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina pro/latente proporcionados en este documento no se unen específicamente al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la Tabla 2a, 11a, 11b o 13 de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2016/098357, que se publicó en 23 de junio de 2016, y que se basa en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/JP2015/006323, que se presentó el 18 de diciembre de 2015. En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina pro/latente proporcionados en este documento no compiten o no compiten de forma cruzada para unirse al mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la Tabla 2a, 11a, 11b o 13 de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2016/098357, que se publicó el 23 de junio de 2016, y que se basa en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/JP2015/006323, que se presentó el 18 de diciembre de 2015. En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina pro/latente proporcionados en este documento no se unen específicamente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende un par  $V_H$  y  $V_L$  descrito en la Tabla 2a, 11a, 11b o 13 de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2016/098357, que se publicó el 23 de junio de 2016, y que se basa en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/JP2015/006323, que se presentó el 18 de diciembre de 2015. En algunas realizaciones, los anticuerpos de miostatina pro/latente proporcionados en este documento no compiten ni compiten entre sí para unirse al mismo epítipo como un anticuerpo que comprende un par  $V_H$  y  $V_L$  descrito en la Tabla 2a, 11a, 11b o 13 de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2016/098357, que fue publicada el 23 de junio de 2016, y que se basa en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/JP2015/006323, que se presentó el 18 de diciembre de 2015.

*Polipéptidos*

**[0130]** Algunos aspectos de la divulgación se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO 29. En algunas realizaciones, el polipéptido es un dominio de cadena pesada variable. En algunas realizaciones, el polipéptido es al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, o SEQ ID NO 29.

**[0131]** Algunos aspectos de la descripción se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consta de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO 35. En algunas realizaciones, el polipéptido es un dominio de cadena ligera variable. En algunas realizaciones, el polipéptido es al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, o SEQ ID NO 35.

*Anticuerpos que compiten con anticuerpos de miostatina anti-pro/latente*

**[0132]** Los aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos que compiten o compiten de forma cruzada con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento. El término "competir", como se usa en este documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo se une a un epítipo de una proteína (por ejemplo, miostatina latente) de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, de modo que el resultado de unir el primer anticuerpo con su epítipo disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando, ya sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos compiten entre sí por la unión de su(s) epítipo(s) respectivo(s). Tanto los anticuerpos que compiten como los que compiten entre sí están dentro del alcance de esta descripción. Independientemente del mecanismo por el cual se produzca dicha competencia o competencia cruzada (p. ej., impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común, o parte del mismo), el experto en la materia apreciaría que tales anticuerpos competidores y/o competidores cruzados son abarcados y pueden ser útiles para los métodos y/o composiciones proporcionados en este documento.

**[0133]** Los aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos que compiten o compiten de forma cruzada con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el documento en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une al mismo epítipo o cerca de él que cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une cerca de un epítipo si se une dentro de 15 o menos residuos de aminoácidos del epítipo. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos de un epítipo que está unido por cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento.

**[0134]** En otra realización, un anticuerpo compite o compite de forma cruzada por la unión a cualquiera de los antígenos proporcionados en este documento (por ejemplo, miostatina pro/latente) con una constante de equilibrio de disociación,  $K_d$ , entre el anticuerpo y la proteína de menos de  $10^{-6}$  M. En otras realizaciones, un anticuerpo compite o compite de forma cruzada por la unión a cualquiera de los antígenos proporcionados en este documento con una  $K_d$  en el intervalo de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M.

**[0135]** Los aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos que compiten por unirse a la miostatina pro/latente con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a la miostatina pro/latente en el mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento se une en o cerca de un sitio de escisión toloide o en o cerca de un sitio de acoplamiento toloide de miostatina pro/latente. En otras realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une en o cerca de un sitio de escisión de proproteína convertasa o en o cerca de un sitio de acoplamiento de proproteína convertasa de miostatina pro/latente. En otra realización, un anticuerpo compite por unirse a miostatina pro/latente con una constante de disociación de equilibrio,  $K_d$ , entre el anticuerpo y la miostatina pro/latente de menos de  $10^{-6}$  M. En otras realizaciones, un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en este documento se une a miostatina pro/latente con una  $K_d$  en que varía de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M.

**[0136]** Cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se pueden caracterizar usando cualquiera de los métodos adecuados. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al que se une el antígeno, o "mapeo de epítopos". Existen muchos métodos adecuados para mapear y caracterizar la ubicación de epítopos en proteínas, incluida la resolución de la estructura cristalina de un complejo de anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. En un ejemplo adicional, se puede usar el mapeo de epítopos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un solo tramo de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar necesariamente contenido

en un solo tramo (secuencia lineal de estructura primaria). Los péptidos de diferentes longitudes (p. ej., de al menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (p. ej., de forma recombinante) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo se puede determinar en un cribado sistemático utilizando péptidos solapantes derivados de la secuencia del antígeno diana y determinando la unión por el anticuerpo.

5 Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el antígeno diana se fragmenta al azar o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados del antígeno con el anticuerpo que se va a analizar. Los fragmentos de genes pueden, por ejemplo, producirse mediante PCR y luego transcribirse y traducirse en proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión

10 del anticuerpo a los fragmentos de antígeno marcados radiactivamente se determina luego mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítipos también pueden identificarse utilizando grandes bibliotecas de secuencias de péptidos aleatorias presentadas en la superficie de las partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, se puede probar una biblioteca definida de fragmentos de péptidos solapantes para determinar la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, se pueden realizar mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de exploración de alanina para identificar los residuos

15 requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítipo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden realizar utilizando un mutante de un antígeno diana en donde varios fragmentos del polipéptido miostatina pro/latente se han reemplazado (intercambiado) con secuencias de una proteína estrechamente relacionada, pero antigénicamente distinta, como otro miembro de la familia de proteínas TGF $\beta$  (por ejemplo, GDF11). Evaluando la unión del anticuerpo a la miostatina pro/latente mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento de antígeno

20 particular para la unión del anticuerpo.

**[0137]** Alternativamente, los ensayos de competición se pueden realizar usando otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno para determinar si se une un anticuerpo al mismo epítipo como los otros anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos de competición.

25 **[0138]** Cualquiera de los métodos adecuados, por ejemplo, los métodos de mapeo de epítipo como se describe en el presente documento, se pueden aplicar para determinar si se une un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente a uno o más de los residuos/segmentos específicos en miostatina pro/latente como se describe en este documento. Además, la interacción del anticuerpo con uno o más de esos residuos definidos en miostatina pro/latente puede determinarse

30 mediante tecnología de rutina. Por ejemplo, se puede determinar una estructura cristalina y, en consecuencia, se pueden determinar las distancias entre los residuos en la miostatina pro/latente y uno o más residuos en el anticuerpo. Basándose en dicha distancia, se puede determinar si un residuo específico en la miostatina pro/latente interactúa con uno o más residuos en el anticuerpo. Además, se pueden aplicar métodos adecuados, tales como ensayos de competición y ensayos de mutagénesis diana para determinar la unión preferencial de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente candidato a

35 miostatina pro/latente en comparación con otra diana, como una miostatina pro/latente mutante.

#### *Producción de anticuerpos que se unen a miostatina pro/latente*

**[0139]** Se pueden usar numerosos métodos para obtener anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos usando métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante la generación de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera luego se

40 criban usando métodos estándar, como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón de superficie (p. ej., OCTET o BIACORE), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno especificado. Se puede usar cualquier forma del antígeno especificado como inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas naturales, cualquier variante o fragmento de la misma, así como péptido antigénico del mismo (por ejemplo, cualquiera de los epítipos descritos en este documento como un epítipo lineal o dentro de un andamio como un epítipo conformacional). Un método ejemplar para producir anticuerpos incluye el cribado de bibliotecas de expresión de proteínas que expresan anticuerpos o fragmentos de los

45 mismos (por ejemplo, scFv), por ejemplo, bibliotecas de presentación de fagos o ribosomas. La presentación de fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., Patente de EE.UU. N° 5,223,409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; Clackson y col. (1991) Nature, 352: 624-628; Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597 WO92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

55 **[0140]** Además de la utilización de bibliotecas de presentación, el antígeno especificado (por ejemplo, promiostatina) se puede utilizar para inmunizar a un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster, o rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

**[0141]** En otra realización, un anticuerpo monoclonal se obtiene a partir del animal no humano, y luego se modifica, por ejemplo, quimérico, utilizando técnicas de ADN recombinante adecuadas. Se han descrito una variedad de enfoques para preparar anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 6851, 1985; Takeda y col., Nature 314: 452, 1985, Cabilly y col., Patente de EE.UU. N° 4.816,567; Boss y col., Patente de EE.UU. N° 4.816,397; Tanaguchi et al., Publicación de patente europea EP171496; Publicación de patente europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B.



**[0142]** Para las técnicas de producción de anticuerpos adicionales, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. La presente divulgación no se limita necesariamente a ninguna fuente, método de producción u otras características especiales de un anticuerpo en particular.

5 **[0143]** Algunos aspectos de la presente descripción se refieren a células huésped transformadas con un polinucleótido o vector. Las células huésped pueden ser procariotas o eucariotas. El polinucleótido o vector que está presente en la célula huésped puede integrarse en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse extracromosómicamente. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o humana. En algunas realizaciones, las células fúngicas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de la especie *S. cerevisiae*. El término "procariótico" incluye todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con moléculas de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina. Los huéspedes procarióticos pueden incluir bacterias gramnegativas así como grampositivas como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariota" incluye levaduras, plantas superiores, insectos y células de vertebrados, por ejemplo, células de mamíferos, tales como células NSO y CHO. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o las cadenas de inmunoglobulina codificadas por el polinucleótido pueden estar glicosilados o no glicosilados. Los anticuerpos o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes también pueden incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial.

20 **[0144]** En algunas realizaciones, una vez que un vector se ha incorporado en un huésped apropiado, el huésped puede ser mantenido en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y, según se desee, la recolección y purificación de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, pueden seguir cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión a antígeno u otras formas de inmunoglobulina; véase, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, NY, (1979). Por tanto, se introducen polinucleótidos o vectores en las células que a su vez producen el anticuerpo o los fragmentos de unión al antígeno. Además, los animales transgénicos, preferiblemente mamíferos, que comprenden las células hospedadoras mencionadas anteriormente pueden usarse para la producción a gran escala del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo.

30 **[0145]** Las células huésped transformadas pueden cultivarse en fermentadores y cultivarse usando cualquiera de las técnicas adecuadas para conseguir un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, otras formas de inmunoglobulina o fragmentos de unión a antígenos, se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluida la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, NY (1982). El anticuerpo o los fragmentos de unión al antígeno pueden aislarse luego del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de la membrana celular. El aislamiento y purificación de, por ejemplo, anticuerpos expresados microbianamente o fragmentos de unión a antígeno puede ser por cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo.

40 **[0146]** Los aspectos de la divulgación se refieren a un hibridoma, que proporciona una fuente indefinidamente prolongada de anticuerpos monoclonales. Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente del cultivo de hibridomas, las células de hibridoma inmortalizadas se pueden utilizar como fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizadas para la expresión y/o manipulación genética posteriores. Los genes de anticuerpos reordenados se pueden transcribir de forma inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada puede intercambiarse por la de un isotipo diferente o eliminarse por completo. Las regiones variables se pueden unir para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Se pueden unir múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden emplear combinaciones quiméricas de cadena pesada y ligera. Puede usarse cualquier método apropiado para la clonación de regiones variables de anticuerpos y la generación de anticuerpos recombinantes.

50 **[0147]** En algunas realizaciones, un ácido nucleico apropiado que codifica regiones variables de una cadena pesada y/o cadena ligera se obtiene y se inserta en vectores de expresión que pueden transfectarse en células huésped recombinantes estándar. Puede usarse una variedad de tales células huésped. En algunas realizaciones, las células huésped de mamíferos pueden ser ventajosas para un procesamiento y producción eficientes. Las líneas celulares de mamíferos típicas útiles para este propósito incluyen células CHO, células 293 o células NSO. La producción del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno puede emprenderse cultivando un huésped recombinante modificado en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se pueden recuperar aislándolos del cultivo. Los sistemas de expresión pueden diseñarse para incluir péptidos señal de modo que los anticuerpos resultantes se secreten al medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

60 **[0148]** La divulgación también incluye un polinucleótido que codifica al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) del V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> de la región variable del anticuerpo producido por cualquiera de los hibridomas descritos anteriormente.

**[0149]** Los polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos pueden ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido sintéticamente o una molécula de ácido nucleico quimérico producida de forma recombinante que comprende cualquiera de esos polinucleótidos solo o en combinación. En algunas realizaciones, un polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas.

**[0150]** En algunas realizaciones, un polinucleótido está unido operativamente a secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. La expresión del polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Pueden incluir secuencias reguladoras que facilitan el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que facilitan la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales y/o regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas incluyen, por ejemplo, el promotor PL, Lac, Trp o Tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, promotor de SV40, promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otras células animales.

**[0151]** Además de elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción tales elementos reguladores también pueden incluir señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión empleado, las secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio pueden añadirse a la secuencia codificante del polinucleótido y se han descrito previamente. La secuencia o secuencias líder se ensamblan en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación y, preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteína traducida, o una porción de la misma, en, por ejemplo, el medio extracelular. Opcionalmente, se puede usar una secuencia polinucleotídica heteróloga que codifica una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C- o N-terminal que imparte las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

**[0152]** En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo una. Asimismo, un polinucleótido puede estar bajo el control del mismo promotor o puede controlarse por separado para la expresión. Además, algunos aspectos se refieren a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno; opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo.

**[0153]** En algunas realizaciones, las secuencias de control de expresión se proporcionan como sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero secuencias de control para huéspedes procariotas también pueden ser utilizados. Los vectores de expresión derivados de virus como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociado, virus del herpes o virus del papiloma bovino, pueden usarse para la administración de los polinucleótidos o el vector en la población de células diana (p. ej., para diseñar una célula para que exprese un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Puede usarse una variedad de métodos apropiados para construir vectores virales recombinantes. En algunas realizaciones, los polinucleótidos y los vectores pueden reconstituirse en liposomas para su administración a las células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos (p. ej., los dominios variables pesados y/o ligeros de las secuencias que codifican las cadenas de inmunoglobulinas y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos adecuados, que varían según el tipo de huésped celular.

## Modificaciones

**[0154]** Los anticuerpos o antígenos fragmentos de unión de la descripción pueden ser modificados con una etiqueta detectable, incluyendo, pero no limitado a una enzima, un grupo prostético, material fluorescente, material luminiscente, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metal emisor de positrones, ion metálico paramagnético no radiactivo y marcador de afinidad para la detección y el aislamiento de miostatina pro/latente. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a los polipéptidos de la divulgación o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador) usando técnicas adecuadas. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos no limitantes de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos no limitantes de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa u otros radioisótopos como, por ejemplo, yodo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ , Lu,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{86}\text{R}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,

<sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se y estaño (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn). La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente de la divulgación o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador) usando técnicas adecuadas. Los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente conjugados con una sustancia detectable pueden usarse para ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento.

#### Composiciones farmacéuticas

**[0155]** Uno o más de los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente pueden mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable (excipiente), incluyendo tampón, para formar una composición farmacéutica para uso en el alivio de una enfermedad o trastorno que se asocia con miopatía. "Aceptable" significa que el vehículo debe ser compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no perjudicial para el sujeto a tratar. Los ejemplos de excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables, que incluyen tampones, serán evidentes para el experto en la materia y se han descrito previamente. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover. En un ejemplo, una composición farmacéutica descrita en el presente documento contiene más de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente que reconocen diferentes epítomos/residuos del antígeno diana.

**[0156]** Las composiciones farmacéuticas para ser utilizadas en los presentes métodos pueden comprender vehículos, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> edición (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecil dimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen adicionalmente en el presente documento.

**[0157]** En algunos ejemplos, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende liposomas que contienen el antipro/anticuerpo latente-miostatina, que se puede preparar por cualquier método adecuado, tal como se describe en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77: 4030 (1980); y la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 5,013,556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

**[0158]** El anticuerpo de miostatina anti-pro/latente también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se han descrito anteriormente técnicas ejemplares, véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000).

**[0159]** En otros ejemplos, la composición farmacéutica descrita en el presente documento pueden formularse en formato de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

**[0160]** Las composiciones farmacéuticas para ser utilizadas para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos se colocan generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

**[0161]** Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden estar en formas de dosificación unitarias tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

5 **[0162]** Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se puede mezclar con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, ingredientes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación, o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente divulgación. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interior y un componente de dosificación exterior, estando este último en forma de sobre sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre el 0,05 y el 5% de agente tensioactivo, y pueden estar entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

30 **[0163]** Las emulsiones adecuadas se pueden preparar usando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o alternativamente puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y se forma una emulsión al mezclar con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta un 20% de aceite, por ejemplo, entre un 5 y un 20%.

35 **[0164]** Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mediante la mezcla de un anticuerpo anti-miostatina con Intralipid™ o los componentes de los mismos (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

40 **[0165]** Las composiciones farmacéuticas para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se indica anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles se pueden nebulizar mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas se pueden respirar directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador se puede conectar a una mascarilla, tienda de campaña o respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo se pueden administrar, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

50 *Uso de anticuerpos de miostatina anti-pro/latentes para el tratamiento de enfermedades/trastornos*

**[0166]** Los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente descritos aquí son eficaces en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con miopatía. Tal como se utiliza aquí, el término "miopatía" se refiere a una enfermedad muscular en donde las fibras musculares no funcionan correctamente, resultando típicamente en debilidad muscular. Las miopatías incluyen enfermedades musculares que son de naturaleza neuromuscular o musculoesquelética. En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía hereditaria. Las miopatías hereditarias incluyen, sin limitación, distrofias, miotonias, miopatías congénitas (p. ej., miopatía nemalínica, miopatía multinúcleo/mininúcleo y miopatía centronuclear), miopatías mitocondriales, miopatías periódicas familiares, miopatías inflamatorias y miopatías metabólicas (p. ej. trastorno de almacenamiento). En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía adquirida. Las miopatías adquiridas incluyen, sin limitación, miopatía inducida por sustancias externas (p. ej., miopatía inducida por fármacos y miopatía por glucocorticoides, miopatía alcohólica y miopatía debida a otros agentes tóxicos), miositis (p. ej., dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión), miositis osificante, rabdomiólisis y mioglobulinurias, y atrofia por desuso. En algunas realizaciones, la miopatía es atrofia por desuso, que puede estar causada por una fractura ósea (por ejemplo, una fractura de cadera) o por una lesión nerviosa (por ejemplo, una lesión de la médula espinal (LME)). En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con una enfermedad o trastorno tal como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinal (AME), síndromes de caquexia debido a insuficiencia renal, SIDA, afecciones cardíacas y/o cáncer. En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con el envejecimiento.

- [0167]** Un aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una miopatía, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía primaria. En otra realización, la miopatía primaria comprende atrofia por desuso. En otras realizaciones, la atrofia por desuso se asocia con fractura de cadera, reemplazo articular electivo, miopatía en cuidados críticos, lesión de la médula espinal o accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, la miopatía es una miopatía secundaria, en la que la pérdida de músculo es secundaria a una patología de la enfermedad. En otras realizaciones, la miopatía secundaria comprende denervación, debilidad muscular genética o caquexia. En otra realización, la miopatía secundaria es una denervación asociada con esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal. En algunas realizaciones, la miopatía secundaria es una debilidad muscular genética asociada con una distrofia muscular. En otras realizaciones, la miopatía secundaria es una caquexia asociada con insuficiencia renal, SIDA, una afección cardíaca, cáncer o envejecimiento.
- [0168]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con el envejecimiento. Las enfermedades y afecciones ejemplares relacionadas con el envejecimiento incluyen, sin limitación, sarcopenia (pérdida de músculo relacionada con la edad), fragilidad y deficiencia de andrógenos.
- [0169]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a atrofia por desuso/trauma. Ejemplos de enfermedades y afecciones relacionadas con la atrofia/trauma por desuso incluyen, sin limitación, debilidad muscular relacionada con el tiempo pasado en una unidad de cuidados intensivos (UCI), reemplazo de cadera/articulación, fractura de cadera, accidente cerebrovascular, reposo en cama, LME, lesión del manguito rotador, reemplazo de rodilla, fractura ósea y quemaduras.
- [0170]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad neurodegenerativa o condición. Las enfermedades o afecciones neurodegenerativas ejemplares incluyen, sin limitación, atrofia muscular espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- [0171]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a la caquexia. Ejemplos de enfermedades y afecciones relacionadas con la caquexia incluyen, sin limitación, cáncer, insuficiencia cardíaca crónica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad renal crónica (ERC).
- [0172]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con las enfermedades raras. Las enfermedades y afecciones raras ejemplares incluyen, sin limitación, osteogénesis imperfecta, miositis por cuerpos de inclusión esporádicos y leucemia linfoblástica aguda.
- [0173]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con un trastorno metabólico y/o la composición corporal. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es obesidad (por ejemplo, obesidad grave), Prader-Willi, diabetes de tipo II o anorexia. Sin embargo, enfermedades o afecciones adicionales relacionadas con trastornos metabólicos y/o composición corporal serían evidentes para el experto en la materia y están dentro del alcance de esta descripción.
- [0174]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a miopatías congénitas. Las miopatías congénitas ejemplares incluyen, sin limitación, miopatía miotubular ligada al cromosoma X, miopatía centronuclear autosómica dominante, miopatía centronuclear autosómica recesiva, miopatía nemalínica y miopatía por desproporción del tipo de fibras congénitas.
- [0175]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada a las distrofias musculares. Distrofias musculares ejemplares incluyen, sin limitación, distrofias musculares de Duchenne, de Becker, facioescapulohumeral (FSH) y de miembros-cinturas.
- [0176]** Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada con uroginecológica, trastornos de glotis (estenosis), miopatía extraocular, túnel carpiano, síndrome de Guillain-Barre, o de osteosarcoma.
- [0177]** Para la práctica del método descrito en el presente documento, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica descrita anteriormente se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) en necesidad del tratamiento a través de una vía adecuada, tal como administración intravenosa, por ejemplo, como una bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, inhalatoria o tópica. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluidos los nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Alternativamente, los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente pueden aerosolizarse usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

**[0178]** El sujeto a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede ser un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas. Un sujeto humano que necesita el tratamiento puede ser un paciente humano que tiene, está en riesgo de padecer o se sospecha que tiene una enfermedad/trastorno asociado con miopatía, como los indicados anteriormente. Un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a la miostatina pro/latente puede identificarse mediante un examen médico de rutina, por ejemplo, pruebas de laboratorio, pruebas funcionales de órganos, tomografías computarizadas o ecografías. Un sujeto sospechoso de tener cualquiera de tales enfermedades/trastornos puede mostrar uno o más síntomas de la enfermedad/trastorno. Un sujeto en riesgo de padecer la enfermedad/trastorno puede ser un sujeto que tenga uno o más de los factores de riesgo para esa enfermedad/trastorno.

**[0179]** "Una cantidad eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de cada agente activo requerida para conferir un efecto terapéutico al sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más de otros agentes activos. Las cantidades efectivas varían, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición física, el tamaño, el sexo y el peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar con sólo una experimentación de rutina. En general, se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el juicio médico sólido. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, psicológicas o virtualmente por cualquier otra razón. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, la aparición o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno o potenciar o mejorar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (p. ej., profiláctica o agente terapéutico).

**[0180]** En algunas realizaciones, en el contexto de la administración de un anticuerpo de miostatina pro/latente a un sujeto, una cantidad eficaz es una cantidad eficaz para aumentar la masa de un músculo diana en el sujeto en comparación con un control de la masa muscular. En algunas realizaciones, el aumento de la masa muscular es un aumento de al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, en al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más en comparación con una masa muscular de control. En algunas realizaciones, el aumento de la masa muscular es un aumento en un rango de 1 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 1 a 1,5 veces, de 1 a 2 veces, etc. en comparación con una masa muscular de control.

**[0181]** Como se usa en este documento, el término "masa muscular de control" se refiere a un estándar de referencia útil para evaluar los efectos de una condición (por ejemplo, tratamiento con un anticuerpo de miostatina pro/latente) en la masa de un músculo diana en un sujeto. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es un valor predeterminado. En algunas realizaciones, se determina experimentalmente una masa muscular de control. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es la masa de un músculo diana en un sujeto al que no se le ha administrado el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es la masa (por ejemplo, la masa media) de un músculo diana en una población de sujetos a los que no se les ha administrado el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es la masa de un músculo diana en un sujeto antes de (p. ej., inmediatamente antes) que se le administre el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es la masa de un músculo diana en un sujeto al que se le ha administrado, en lugar del anticuerpo de miostatina pro/latente, un anticuerpo normal (por ejemplo, del mismo isotipo que el anticuerpo de miostatina pro/latente) que se ha obtenido de un animal que no ha estado expuesto al antígeno al que se dirige el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una masa muscular de control es la masa de un músculo diana en un sujeto al que se le ha administrado, en lugar del anticuerpo de miostatina pro/latente, un vehículo, por ejemplo, solución salina.

**[0182]** En algunas realizaciones, en el contexto de la administración de un anticuerpo de miostatina pro/latente a un sujeto, una cantidad eficaz es una cantidad eficaz para aumentar la capacidad de generación de fuerza (por ejemplo, una generación de fuerza máxima como se determinó *in vitro* con un sistema de palanca muscular adaptado con un baño de perfusión horizontal) de un músculo diana en el sujeto en comparación con una capacidad de generación de fuerza de control. En algunas realizaciones, el aumento en la capacidad de generación de fuerza es un aumento de al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más en comparación con una capacidad de generación de fuerza de control. En algunas realizaciones, el aumento en la capacidad de generación de fuerza es un aumento en un rango de 1 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 1 a 1,5 veces, de 1 a 2 veces, etc. en comparación con un control de generación de la fuerza de la capacidad.

**[0183]** Como se usa en este documento, el término "capacidad de generación de fuerza de control" se refiere a un estándar de referencia útil para evaluar los efectos de una condición (por ejemplo, tratamiento con un anticuerpo de miostatina pro/latente) en la capacidad de generación de fuerza de un músculo en un sujeto. En algunas realizaciones,

una capacidad de generación de fuerza de control es un valor predeterminado. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control se determina experimentalmente. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control es la capacidad de generación de fuerza de un músculo diana en un sujeto al que no se le ha administrado el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control es la capacidad de generación de fuerza (por ejemplo, la capacidad de generación de fuerza media) de un músculo diana en una población de sujetos a los que no se les ha administrado el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control es la capacidad de generación de fuerza de un músculo diana en un sujeto antes (por ejemplo, inmediatamente antes de) que se le administre el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control es la capacidad de generación de fuerza de un músculo diana en un sujeto al que se le ha administrado, en lugar del anticuerpo de miostatina pro/latente, un anticuerpo normal (por ejemplo, del mismo isotipo que el anticuerpo de miostatina pro/latente) que se ha obtenido de un animal que no ha estado expuesto al antígeno al que se dirige el anticuerpo de miostatina pro/latente. En algunas realizaciones, una capacidad de generación de fuerza de control es la capacidad de generación de fuerza de un músculo diana en un sujeto al que se le ha administrado, en lugar del anticuerpo de miostatina pro/latente, un vehículo, por ejemplo, solución salina.

**[0184]** Consideraciones empíricas, tales como la vida media, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunológico humano, como los anticuerpos humanizados o los anticuerpos completamente humanos, pueden usarse para prolongar la vida media del anticuerpo y evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunológico del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el curso de la terapia, y generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso de una enfermedad/trastorno asociado con miopatía. Alternativamente, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua sostenida de una miostatina anti-pro/latente. Varias formulaciones y dispositivos para lograr una liberación sostenida serían evidentes para el experto en la técnica y están dentro del alcance de esta descripción.

**[0185]** En un ejemplo, las dosificaciones para un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente tal como se describe en el presente documento puede determinarse empíricamente en individuos que han recibido una o más administración(es) del anticuerpo. Los individuos reciben dosis incrementales del antagonista. Para evaluar la eficacia del antagonista, se puede seguir un indicador de la enfermedad/trastorno.

**[0186]** En general, para la administración de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, una dosis inicial candidata puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. A los efectos de la presente divulgación, una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a 3 g/kg a 30 mg/kg a 300 mg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcancen niveles terapéuticos suficientes para aliviar una enfermedad o trastorno asociado con la miostatina pro/latente, o un síntoma de la misma. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de deterioro farmacocinético que desee lograr el médico. Por ejemplo, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. En algunas realizaciones, la dosificación varía de aproximadamente 3 mg/mg a aproximadamente 2 mg/kg (como aproximadamente 3 mg/mg, aproximadamente 10 mg/mg, aproximadamente 30 mg/mg, aproximadamente 100 mg/mg, aproximadamente 300 mg/mg, aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg). En algunas realizaciones, la frecuencia de dosificación es una vez a la semana, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas o cada 10 semanas; o una vez al mes, cada 2 meses, o cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses, cada 8 meses, cada 10 meses, cada año o más. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluido el anticuerpo utilizado) puede variar con el tiempo.

**[0187]** En algunas realizaciones, para un paciente adulto de peso normal, pueden ser administradas dosis que varían de aproximadamente 0,3 a 5,00 mg/kg. El régimen de dosificación particular, por ejemplo, dosis, tiempo y repetición, dependerá del individuo en particular y del historial médico de ese individuo, así como de las propiedades de los agentes individuales (como la vida media del agente y otras consideraciones relevantes).

**[0188]** Para los fines de la presente descripción, la dosificación apropiada de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se dependerá del anticuerpo específico (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y gravedad de la enfermedad/trastorno, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al antagonista, y la discreción del médico tratante. En algunas realizaciones, un médico administrará un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente, hasta que se alcance una dosis que logre el resultado deseado. La administración de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de

dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con miostatina pro/latente.

**[0189]** Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o agentes más activos para un sujeto, que tiene una enfermedad/trastorno asociado con miopatía, un síntoma de la enfermedad/trastorno o una predisposición hacia la enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar el trastorno, el síntoma de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad/trastorno.

**[0190]** Aliviar una enfermedad/trastorno asociado con la miostatina pro/latente incluye retrasar el desarrollo o progresión de la enfermedad, o reducir la gravedad de la enfermedad. Aliviar la enfermedad no requiere necesariamente resultados curativos. Tal como se utiliza allí, "retrasar" el desarrollo de una enfermedad/trastorno asociado con miostatina pro/latente significa diferir, obstaculizar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer la progresión de la enfermedad. Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o de las personas a las que se esté tratando. Un método que "retrasa" o alivia el desarrollo de una enfermedad, o retrasa la aparición de la enfermedad, es un método que reduce la probabilidad de desarrollar uno o más síntomas de la enfermedad en un período de tiempo determinado y/o reduce la extensión de los síntomas en un período de tiempo determinado, en comparación con no utilizar el método. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, utilizando un número suficiente de sujetos para dar un resultado estadísticamente significativo.

**[0191]** "Desarrollo" o "progresión" de una enfermedad significa manifestaciones iniciales y/o progresión subsiguiente de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad puede detectarse y evaluarse utilizando técnicas clínicas estándar. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a una progresión que puede ser indetectable. A los efectos de esta divulgación, el desarrollo o progresión se refiere al curso biológico de los síntomas. El "desarrollo" incluye la aparición, la recurrencia y la aparición. Como se usa en el presente documento, "inicio" o "aparición" de una enfermedad/trastorno asociado con miopatía incluye aparición inicial y/o recurrencia.

**[0192]** En algunas realizaciones, el anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se describe en el presente documento se administra a un sujeto en necesidad del tratamiento en una cantidad suficiente para inhibir la activación proteolítica de miostatina pro/latente a miostatina activa por al menos 20% (por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) *in vivo*. En otras realizaciones, se administra un anticuerpo en una cantidad eficaz para reducir el nivel de miostatina pro/latente o miostatina latente en al menos un 20% (por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más).

**[0193]** Los métodos convencionales, conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica de la medicina, se pueden usar para administrar la composición farmacéutica al sujeto, dependiendo del tipo de enfermedad a tratar o en el sitio de la enfermedad. Esta composición también puede administrarse por otras vías convencionales, por ejemplo, administrada por vía oral, parenteral, por pulverización de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal. Además, se puede administrar al sujeto a través de vías de administración de depósito inyectable tales como el uso de materiales y métodos biodegradables o inyectables de depósito de 1, 3 o 6 meses.

**[0194]** Las composiciones inyectables pueden contener varios vehículos, tales como aceites vegetales, dimetilactamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol y polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares). Para la inyección intravenosa, los anticuerpos solubles en agua se pueden administrar mediante el método de goteo, mediante el cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene el anticuerpo y excipientes fisiológicamente aceptables. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, dextrosa al 5%, solución salina al 0,9%, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Las preparaciones intramusculares, por ejemplo, una formulación estéril de una forma de sal soluble adecuada del anticuerpo, se pueden disolver y administrar en un excipiente farmacéutico tal como agua para inyección, solución salina al 0,9% o solución de glucosa al 5%.

**[0195]** En una realización, un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente se administra a través de sitio específico o técnicas de administración local diana. Ejemplos de técnicas de administración local específicas o dirigidas al sitio incluyen varias fuentes de depósito implantables del anticuerpo de miostatina anti-pro/latente o catéteres de administración local, tales como catéteres de infusión, un catéter permanente o un catéter de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y stents u otros dispositivos implantables, portadores específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Véanse, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 00/53211 y la patente de EE.UU. N° 5,981,568.

**[0196]** También puede ser utilizada la administración dirigida de composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido o vector de expresión. Las técnicas de administración de ADN mediadas por receptores se describen, por ejemplo, en Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11: 202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (JA Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1990) 87: 3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266: 338.



**[0197]** Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido (por ejemplo, los que codifican los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente descritos en este documento) se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. En algunas realizaciones, los rangos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg y aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg de ADN o más también se pueden usar durante un protocolo de terapia genética.

**[0198]** Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos descritos en este documento pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen viral o no viral (ver en general, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6: 148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores y/o potenciadores endógenos de mamíferos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

**[0199]** Los vectores basados en virus adecuados para la administración de un polinucleótido deseado (por ejemplo, que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento) y la expresión en una célula deseada están dentro del alcance de esta descripción. Los ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero no se limitan a retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, los números de publicación PCT WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patente de EE. UU. N° 5,219,740 y 4,777,127; GB Patente N° 2,200,651; y la Patente EP N° 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147.

**[0200]** Vehículos y métodos de entrega no víricos también se pueden emplear, incluyendo, pero no limitado a ADN condensado policatiónico unido o no a adenovirus muerto solo (ver, por ejemplo, Curiel, Hum Gene Ther (1992) 3: 147); ADN ligado a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985); células portadoras de células eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,814,482; las publicaciones PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de la carga nucleica o fusión con células membranas. También se puede emplear ADN desnudo. Se describen métodos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la publicación PCT N° WO 90/11092 y la patente de EE.UU. N° 5,580,859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes se describen en la patente de EE.UU. N° 5,422,120; Publicaciones PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y Patente EP N° 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14: 2411 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

**[0201]** El régimen de dosificación particular, por ejemplo, dosis, tiempo y repetición, que se utiliza en el método descrito en el presente documento se dependerá del sujeto particular y del historial clínico del sujeto.

**[0202]** En algunas realizaciones, los anticuerpos con más de una miostatina anti-pro/latente, o una combinación de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente y otro agente terapéutico adecuado, se puede administrar a un sujeto en necesidad del tratamiento. El antagonista puede ser del mismo tipo o diferente entre sí. El anticuerpo de miostatina anti-pro/latente también se puede usar junto con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

**[0203]** La eficacia del tratamiento para una enfermedad/trastorno asociado con miopatía se puede evaluar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento para una enfermedad/trastorno asociado con miopatía se puede evaluar evaluando la debilidad muscular (p. ej., evaluando el patrón y la gravedad de la debilidad), electromiografía, evaluando la química sanguínea (p. ej., evaluando electrolitos, evaluando causas endocrinas, midiendo la creatinina quinasa nivel, determinación de la velocidad de sedimentación globular y realización de ensayos de anticuerpos antinucleares) y evaluación de biopsias (p. ej., mediante análisis histológico, histoquímico, microscópico electrónico, bioquímico y genético).

*Kits para uso en el alivio de enfermedades/trastornos asociados con miopatía*

**[0204]** La presente descripción también proporciona kits para uso en el alivio de enfermedades/trastornos asociados con miopatía. Dichos kits pueden incluir uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento.

**[0205]** En algunas realizaciones, el kit puede comprender instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la administración del anticuerpo de miostatina anti-pro/latente para tratar, retrasar la aparición o aliviar una enfermedad diana como las descritas en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basándose en la identificación de si ese individuo tiene la enfermedad diana.

En otras realizaciones más, las instrucciones comprenden una descripción de la administración de un anticuerpo a un individuo con riesgo de padecer la enfermedad diana.

**[0206]** Las instrucciones relativas a la utilización de un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente, generalmente, incluyen información en cuanto a la dosificación, programa de dosificación, y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multidosis) o subunidades. También son aceptables las instrucciones suministradas en los kits de la divulgación que suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero también se incluyen instrucciones legibles por máquina (p. ej., instrucciones en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

**[0207]** La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar, retardar la aparición y/o aliviar una enfermedad o trastorno asociado con miopatía. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en este documento.

**[0208]** Los kits de la presente divulgación están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de plástico o Mylar selladas) y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de miostatina anti-pro/latente como los descritos en el presente documento.

**[0209]** Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto(s) en el recipiente o asociados con él. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden el contenido de los kits descritos anteriormente.

#### *Ensayos para detectar miostatina pro/latente*

**[0210]** En algunas realizaciones, los métodos y composiciones proporcionados en este documento se refieren a un método para detectar miostatina pro/latente en una muestra obtenida de un sujeto. Como se usa en este documento, un "sujeto" se refiere a un organismo individual, por ejemplo, un mamífero individual. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un primate no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un roedor. En algunas realizaciones, el sujeto es una oveja, una cabra, un ganado, un gato o un perro. En algunas realizaciones, el sujeto es un vertebrado, un anfibio, un reptil, un pez, un insecto, una mosca o un nematodo. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal de investigación. En algunas realizaciones, el sujeto está modificado genéticamente, por ejemplo, un sujeto no humano modificado genéticamente. El sujeto puede ser de cualquier sexo y en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente o un voluntario sano.

**[0211]** En algunas realizaciones, un método para detectar una miostatina pro/latente en una muestra obtenida de un sujeto implica (a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo de miostatina anti-pro/latente en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al antígeno, si el antígeno está presente en la muestra, formando así complejos de unión; y (b) determinar el nivel del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno unido al antígeno (por ejemplo, determinar el nivel de los complejos de unión).

**[0212]** Como se usa en el presente documento un complejo de unión se refiere a un complejo biomolecular de anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) unido a antígeno (por ejemplo, proteína de miostatina pro/latente). Los complejos de unión pueden comprender anticuerpos con una sola especificidad o dos o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno con diferentes especificidades. En una realización, un complejo de unión comprende dos o más anticuerpos que reconocen diferentes sitios antigénicos en el mismo antígeno. En algunos casos, un anticuerpo puede estar unido a un antígeno, habiendo unido a él otras biomoléculas como ARN, ADN, polisacáridos o proteínas. En una realización, un complejo de unión comprende dos o más anticuerpos que reconocen diferentes antígenos. En algunas realizaciones, un anticuerpo en un complejo de unión (por ejemplo, un anticuerpo inmovilizado unido a un antígeno), puede unirse, como un antígeno, a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo marcado de forma detectable). Por tanto, los complejos de unión pueden, en algunos casos, comprender múltiples antígenos y múltiples anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos.

**[0213]** Los antígenos presentes en los complejos de unión pueden estar o no en su conformación *in situ* nativa. En algunas realizaciones, se forma un complejo de unión entre un anticuerpo y un antígeno proteico purificado, o proteínas aisladas que comprenden antígeno, en donde el antígeno no está en su conformación *in situ* nativa. En algunas realizaciones, se forma un complejo de unión entre un anticuerpo y un antígeno proteico purificado, en donde el antígeno no está en su conformación *in situ* nativa y está inmovilizado sobre un soporte sólido (por ejemplo, una membrana de

PVDF). En algunas realizaciones, se forma un complejo de unión con un anticuerpo y, por ejemplo, una proteína de la superficie celular que está presente *in situ* en una confirmación nativa (por ejemplo, en la superficie de una célula).

**[0214]** Los anticuerpos en complejos de unión pueden o pueden no ser marcados de forma detectable. En algunas realizaciones, los complejos de unión comprenden anticuerpos marcados de forma detectable y anticuerpos no marcados. En algunas realizaciones, los complejos de unión comprenden un antígeno marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, los anticuerpos, en complejos de unión, se inmovilizan en uno o más soportes sólidos. En algunas realizaciones, los antígenos, en complejos de unión, se inmovilizan en uno o más soportes sólidos. Los soportes sólidos ejemplares se describen en este documento y serán evidentes para un experto en la técnica. Los ejemplos anteriores de complejos de unión no pretenden ser limitantes. Otros ejemplos de complejos de unión serán evidentes para un experto en la técnica.

**[0215]** En cualquiera de los métodos de detección, el diagnóstico y el seguimiento, el anticuerpo, (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) o antígeno puede conjugarse a una superficie de soporte sólido, ya sea directa o indirectamente. Los métodos para la conjugación con soportes sólidos son estándares y se pueden lograr mediante interacciones covalentes y no covalentes. Los ejemplos no limitantes de métodos de conjugación incluyen: adsorción, entrecruzamiento, interacciones proteína A/G-anticuerpo e interacciones estreptavidina-biotina. Otros métodos de conjugación serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

**[0216]** En algunos aspectos, detección, diagnóstico y métodos de control incluyen comparar el nivel de anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) unido al antígeno (por ejemplo, miostatina pro/latente) a uno o más estándares de referencia. El estándar de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel de una miostatina pro/latente correspondiente en un sujeto que tiene o no tiene una miostatina pro/latente. En una realización, el estándar de referencia es el nivel de miostatina pro/latente detectado en una muestra que no contiene miostatina pro/latente (por ejemplo, un nivel de fondo). Alternativamente, se puede determinar un nivel de fondo a partir de una muestra que contiene una miostatina pro/latente particular, poniendo en contacto la muestra con anticuerpos no específicos (por ejemplo, anticuerpos obtenidos de suero no inmune). Por otra parte, el estándar de referencia puede ser el nivel de miostatina pro/latente detectado en una muestra que sí contiene miostatina pro/latente (por ejemplo, un control positivo). En algunos casos, el estándar de referencia puede ser una serie de niveles asociados con concentraciones variables de miostatina pro/latente en una muestra y útil para cuantificar la concentración de miostatina pro/latente en la muestra de prueba. Los ejemplos anteriores de patrones de referencia no son limitantes y otro patrón de referencia adecuado será fácilmente evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. En algunas realizaciones, el nivel del anticuerpo unido a la miostatina pro/latente se compara con el nivel de miostatina madura. En algunos casos, el nivel de miostatina pro/latente se compara con la miostatina madura para determinar la proporción de miostatina inactiva a activa en la muestra.

**[0217]** El nivel de miostatina pro/latente se puede medir, como se proporciona aquí, a partir de una muestra biológica. Una muestra biológica se refiere a cualquier material biológico que pueda obtenerse de un sujeto o célula. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser sangre completa, plasma, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, células (o lisado celular) o tejido (por ejemplo, tejido normal o tejido tumoral). En algunas realizaciones, una muestra biológica es una muestra de fluido. En algunas realizaciones, una muestra biológica es una muestra de tejido sólido. Por ejemplo, una muestra de tejido puede incluir, sin limitación, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido adiposo así como tejido de otros órganos. En algunas realizaciones, una muestra biológica es una muestra de biopsia. En algunas realizaciones, una muestra de tejido sólido se puede convertir en una muestra de fluido usando métodos rutinarios en la técnica.

**[0218]** Una muestra biológica también puede incluir una o más células de una línea celular. En algunas realizaciones, una línea celular incluye células humanas, células de primates (por ejemplo, células vero), células de rata (por ejemplo, células GH3, células OC23) o células de ratón (por ejemplo, células MC3T3). Hay una variedad de líneas celulares humanas, que incluyen, entre otras, células de riñón embrionario humano (HEK), células HeLa, células cancerosas de las 60 líneas celulares cancerosas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI60), células DU145 (cáncer de próstata), células Lncap (próstata), células MCF-7 (cáncer de mama), células MDA-MB-438 (cáncer de mama), células PC3 (cáncer de próstata), células T47D (cáncer de mama), células THP-1 (leucemia mieloide aguda), U87 (glioblastoma), células de neuroblastoma humano SHSY5Y (clonadas a partir de un mieloma) y células Saos-2 (cáncer de hueso).

**[0219]** Una realización adicional se refiere a un método para el seguimiento de una enfermedad, una afección, o cualquier tratamiento de la misma (por ejemplo, miopatía o tratamiento de miopatía) en un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, la enfermedad o afección que comprende: (a) obtener una muestra biológica del sujeto, (b) determinar el nivel de una miostatina pro/latente en la muestra biológica utilizando un anticuerpo que detecta miostatina pro/latente, y (c) repetir los pasos (a) y (b) en una o más ocasiones. La miostatina se ha utilizado como un biomarcador para la atrofia muscular, sin embargo, los métodos disponibles actualmente comerciales y reactivos (*p. ej.*, anticuerpos utilizados en pruebas ELISA y transferencias de Western) no son ya sea específica para miostatina, sólo detectan miostatina madura o no detectan miostatina en absoluto. Por tanto, en el presente documento se proporcionan métodos y reactivos (por ejemplo, anticuerpos) para detectar miostatina pro/latente en el contexto de enfermedades y/o afecciones (por ejemplo, atrofia muscular) con fines de diagnóstico. Como ejemplo, el nivel de miostatina pro/latente puede medirse en un sujeto, o en una muestra biológica del mismo, para detectar o controlar la progresión de una enfermedad o afección. Como otro ejemplo, el nivel de miostatina pro/latente puede medirse en un sujeto, o una muestra biológica del mismo, para controlar

la respuesta a un tratamiento para una enfermedad o afección. Debe apreciarse que el nivel de miostatina pro/latente puede controlarse durante cualquier período de tiempo adecuado, que puede diferir dependiendo de la enfermedad o afección que tenga el sujeto o de cualquier régimen de tratamiento al que pueda estar sujeto.

5 **[0220]** Otra realización se refiere a una composición de diagnóstico que comprende uno cualquiera de los anteriores anticuerpos descritos, fragmentos de unión del antígeno, polinucleótidos, vectores o células y los medios opcionalmente adecuados para la detección. Los anticuerpos son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Ejemplos de tales  
10 inmunoensayos son el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), el sándwich (ensayo inmunométrico), la citometría de flujo, el ensayo de transferencia Western, los ensayos de inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunoscopia, ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral y matrices proteómicas. Los antígenos y anticuerpos pueden unirse a muchos soportes sólidos diferentes (p. ej., vehículos, membranas, columnas, matriz proteómica, etc.). Los ejemplos de materiales de soporte sólidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, difluoruro de polivinilideno, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, tales como nitrocelulosa, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del soporte puede fijarse o suspenderse en una solución (por ejemplo, perlas).

**[0221]** Por una forma de realización adicional, los anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión a antígeno) proporcionados en este documento también pueden usarse en un método para evaluar la expresión de miostatina pro/latente en un sujeto mediante la obtención de una muestra biológica del sujeto que puede ser una muestra de tejido, una muestra de sangre o cualquier otra muestra de fluido corporal apropiada. El procedimiento puede comprender poner en contacto la muestra de sangre (sangre completa, suero, plasma), una muestra de tejido o una muestra de proteína aislada de la misma, con un anticuerpo, en condiciones que permitan la formación de complejos de unión entre el anticuerpo y el antígeno. El nivel de tales complejos de unión puede determinarse luego mediante cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, la muestra biológica se pone en contacto con el anticuerpo en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a una proteína de miostatina pro/latente, si el antígeno está presente en la muestra, y la formación de complejos de unión que consisten en anticuerpo, unido a la antígeno. Esta etapa de contacto se realiza típicamente en una cámara de reacción, tal como un tubo, pocillo de placa, baño de membrana, placa de cultivo celular, portaobjetos de microscopio y similares. En algunas realizaciones, un anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, el antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es la superficie de la cámara de reacción. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una membrana polimérica (por ejemplo, tira de nitrocelulosa, membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.). Pueden usarse otros soportes sólidos apropiados.

**[0222]** En algunas realizaciones, un anticuerpo se inmoviliza en el soporte sólido antes de contactar con el antígeno. En otras realizaciones, la inmovilización del anticuerpo se realiza después de la formación de complejos de unión. En otras realizaciones más, el antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido antes de la formación de los complejos de unión. Se añade un reactivo de detección a la cámara de reacción para detectar complejos de unión inmovilizados. En algunas realizaciones, el reactivo de detección comprende un anticuerpo secundario marcado de forma detectable dirigido contra el antígeno. En algunas realizaciones, el propio anticuerpo primario está marcado de forma detectable y, por tanto, es el reactivo de detección.

**[0223]** En un aspecto, los métodos de detección comprenden las etapas de inmovilización de anticuerpos a un soporte sólido; aplicar una muestra (por ejemplo, una muestra biológica o una muestra de proteína aislada) al soporte sólido en condiciones que permitan la unión del antígeno a los anticuerpos, si están presentes en la muestra; retirar el exceso de muestra del soporte sólido; aplicar anticuerpos marcados de forma detectable en condiciones que permitan la unión de los anticuerpos marcados de forma detectable a los anticuerpos inmovilizados unidos al antígeno; lavar el soporte sólido y ensayar la presencia de marca en el soporte sólido.

**[0224]** En algunas realizaciones, el antígeno se inmoviliza sobre el soporte sólido, como una membrana de PVDF, antes de entrar en contacto con el anticuerpo en una cámara de reacción (por ejemplo, un baño de membrana). Se agrega un reactivo de detección a la cámara de reacción para detectar complejos de unión inmovilizados. En algunas realizaciones, el reactivo de detección comprende un anticuerpo secundario marcado de forma detectable dirigido contra el antígeno. En algunas realizaciones, el reactivo de detección comprende un anticuerpo secundario marcado de forma detectable dirigido contra el anticuerpo primario. Como se describe en el presente documento, el marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo, una molécula luminiscente, una enzima, un resto biotina, un epítipo marcador o una molécula de colorante. En algunas realizaciones, el propio anticuerpo primario está marcado de forma detectable y, por tanto, es el reactivo de detección. Los marcadores detectables adecuados se describen en el presente documento y serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

**[0225]** En consecuencia, se proporcionan kits de diagnóstico, adecuados para uso doméstico o clínico (servicio de punto de atención) que comprenden (a) anticuerpos marcados y/o no marcados detectablemente, como reactivos de unión a antígeno (por ejemplo, reactivos de unión a miostatina pro/latente); (b) un reactivo de detección; y, opcionalmente, (c) instrucciones completas para usar los reactivos para detectar antígenos en una muestra. En algunas realizaciones, el kit de diagnóstico incluye el anticuerpo y/o miostatina pro/latente inmovilizados sobre un soporte sólido. Cualquiera de los

soportes sólidos descritos en este documento es adecuado para su incorporación en los kits de diagnóstico. En una realización preferida, el soporte sólido es la superficie de una cámara de reacción de un pocillo de placa. Normalmente, el pocillo de la placa está en una placa de pocillos múltiples que tiene varios pocillos seleccionados entre: 6, 12, 24, 96, 384 y 1536, pero no está tan limitado. En otras realizaciones, los kits de diagnóstico proporcionan un anticuerpo marcado de forma detectable. Los kits de diagnóstico no se limitan a estas realizaciones y otras variaciones en la composición del kit serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

**[0226]** Las siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, deben interpretarse como meramente ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno.

## EJEMPLOS

### *Ejemplo 1: Generación y selección de anticuerpos*

#### *Resumen de anticuerpos*

**[0227]** Ab2 es un anticuerpo monoclonal de miostatina anti-pro/latente del isotipo IgG<sub>4</sub>/lambda completamente humano que se une a miostatina pro y latente humana con alta afinidad ( $K_d = 3420$  pM de ForteBio BLI). El anticuerpo es capaz de inhibir la activación proteolítica de miostatina pro/latente con valores de  $CI_{50}$  en el rango de 0,5 micromolar (que está en o cerca del límite del ensayo). El peso molecular teórico del polipéptido es 144.736 Da y su pI teórico es 6,7. Se realizó la optimización de la afinidad usando la presentación de anticuerpos para identificar variantes de mayor afinidad Ab4 y Ab6. Las variantes optimizadas por afinidad se construyen de forma similar en las estructuras de isotipo IgG<sub>4</sub>/lambda humana.

Tabla 2: Propiedades bioquímicas de los anticuerpos candidatos de miostatina anti-pro/latente

Anticuerpo	Afinidad (octeto) pM	MW (Da) * teórico aglicosilado	PI calculado
Ab1	4760	144809,8	6,9
Ab2	3420	144735,6	6,7
Ab4	472	144661,7	6,7
Ab6	331	144629,5	6,7

#### *Plataforma e identificación del anticuerpo parental*

**[0228]** El anticuerpo Ab1 parental se identificó mediante la selección de una biblioteca de presentación de fagos sin tratamiento previo utilizando miostatina pro y latente como antígenos primarios para la selección. La selección de fagos y el cribado inicial se realizaron utilizando una biblioteca que muestra scFv convencional en un formato similar al descrito por McCafferty et al. (McCafferty et al., 1990). Cada ronda de selección consistió en un aclaramiento previo (para la eliminación de anticuerpos de fagos inespecíficos), incubación con antígeno, lavado, elución y amplificación. Las selecciones se realizaron mediante múltiples rondas usando estrategias de cribado en fase sólida (antígenos biotinilados recubiertos en inmunotubos) y en fase de solución (antígenos biotinilados, capturados usando perlas recubiertas de estreptavidina).

**[0229]** En total, 10.000 clones de scFv individuales se cribaron para la unión a miostatina pro y latente a través de dos campañas separadas. El primer programa utilizó miostatina pro/latente como antígeno, mientras que una segunda campaña utilizó miostatina latente como antígeno. Se secuenció el ADN de los clones scFv de interés y se identificaron 216 clones únicos. Los clones scFv de unión positiva se contrarrestaron para determinar la unión a proGDF11 así como a un panel de proteínas no relacionadas para confirmar la especificidad por la miostatina pro/latente. Del panel de clones scFv únicos, 101 (de 134 clones específicos de GDF8) se convirtieron en IgG de longitud completa (isotipo IgG1) para una caracterización adicional.

**[0230]** Los anticuerpos IgG de longitud completa se caracterizaron adicionalmente por ELISA para la unión a las formas pro y latente humana y murina de miostatina y GDF-11. También se examinaron los anticuerpos para determinar su unión al prodominio de miostatina, proTGF $\beta$  (humano y murino), el factor de crecimiento maduro de miostatina, el factor de crecimiento maduro GDF11, el factor de crecimiento de activina A y la proActivina A. Los anticuerpos principales se seleccionaron en función de su reactividad cruzada con miostatina pro y latente humana y murina, sin interacciones con las proteínas GDF11, activina o TGF $\beta$ .

**[0231]** Se emplearon dos formas de agrupamiento de epítomos. En primer lugar, se diseñaron y produjeron construcciones quiméricas que intercambiaban porciones de los prodominios de miostatina y GDF11. Se ensayó la interacción de estas proteínas quiméricas con anticuerpos de cribado mediante ELISA. La agrupación de epítomos se llevó a cabo utilizando un instrumento ForteBio BLI, en donde el anticuerpo de miostatina pro/latente biotinilado se inmovilizó en un chip biosensor recubierto de estreptavidina, y se evaluó el bloqueo cruzado de anticuerpos mediante la respuesta del sensor. Estos experimentos de agrupación de epítomos, junto con los datos de los experimentos de unión de ELISA,

permitieron la segregación de nuestros anticuerpos principales funcionalmente activos (ver más abajo) en tres grupos de epítopos distintos (ver Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de cinco anticuerpos IgG1 miostatina anti-pro/latente

ID de clon	proGDF8 Kd (μM) (octeto)	proGDF8 2 CI50 humano (μM) Ensayo reportero	proGDF8 2 CI50 murino (mM) Ensayo reportero	% de aumento de peso corporal en 6 semanas 25 mg/kg/semana	% de aumento de masa magra en 4 semanas 20 mg/kg/semana	Papelera de epítipo
Ab1	11,5	0,996	1,46	14,58*	14,1*	1
Ab7	28	0,983	1,68	12,42*	ND	1
Ab8	0,5	6,037	1391	10,33*	7,4	2
Ab9	22	12,16	19,86	7,44	ND	3
Ab10	0,3	0,772	ND	ND	14,3*	1
*Significación estadística por ANOVA de una vía con Dunnett. Ab8 no se une a la miostatina latente, solo a la proMiostatina. Las preparaciones de miostatina pro/latente murina tienen ~ 40% de material latente que reduce la eficacia aparente en los ensayos funcionales. ND: No determinado.						

**[0232]** Con el fin de evaluar la capacidad de anticuerpos para unirse e inhibir la activación de miostatina pro/latente, se estableció un número de ensayos bioquímicos y celulares. La cinética de unión a la miostatina pro latente y latente se midió mediante ForteBio Octet, en donde la proteína de sustrato biotinilada se inmovilizó en chips sensores recubiertos con estreptavidina. Las constantes de equilibrio de disociación de los candidatos de selección se muestran en la Tabla 3.

**[0233]** Para medir la capacidad de las IgG para inhibir la señalización de miostatina, se desarrolló un ensayo de activación de miostatina. Se produjo medio acondicionado de células que sobreexpresan mT112 (la proteasa toloide necesaria para la activación de la miostatina) o Furina (la proproteína convertasa que escinde el factor de crecimiento maduro del prodominio). Después de la preincubación con el anticuerpo de prueba, se incubó miostatina pro/latente o miostatina latente con una mezcla de medio acondicionado mT112 y Furina (proMiostatina) o medio acondicionado mT112 (miostatina latente). Después de una reacción de proteólisis durante la noche, se midió la liberación de factor de crecimiento maduro usando un ensayo indicador basado en CAGA en células 293T. Los anticuerpos se validaron adicionalmente por respuesta a la dosis, en el mismo ensayo, los resultados de los cuales se muestran en la Tabla 3.

**[0234]** Cinco anticuerpos parentales (Tabla 3) demostraron consistentemente potente selectividad y actividad en todos los anteriores ensayos y fueron elegidos adicionalmente durante caracterización adicional *in vivo* (discutida en el Ejemplo 2). Por coherencia, se resume la unión y la actividad de estos anticuerpos hacia la miostatina pro/latente, ya que Ab8 no reconoce la miostatina latente.

**[0235]** Para determinar el mecanismo de acción de los candidatos de anticuerpos, las muestras se analizaron por transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal generado contra el prodominio de miostatina, tal como se muestra en la Figura 3. Esto permitió el seguimiento de un fragmento (en caja) del prodominio de miostatina que se genera después de la escisión de mT112. Se observó una disminución dependiente de la dosis en la generación de este fragmento a medida que aumenta la concentración de Ab1. Este experimento indica que los anticuerpos en el epítipo bin 1 actúan bloqueando la escisión de miostatina pro y latente por la familia toloide de proteasas.

**[0236]** En base a la actividad *in vitro* e *in vivo* de los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente activos, se seleccionó Ab1 como líder para una optimización adicional, incluida la maduración por afinidad, la formación de germinación y el análisis de capacidad de fabricación.

#### Optimización de Ab1

**[0237]** Se seleccionó el anticuerpo Ab1 para una mayor optimización. La afinidad por la miostatina pro/latente se optimizó usando presentación de levadura. Además, la secuencia de Ab1 se modificó mediante germinación para reducir el riesgo de inmunogenicidad potencial de las posiciones de aminoácidos no de la línea germinal dentro de los marcos de las regiones variables humanas.

#### Optimización de afinidad de Ab1 por presentación en levadura

**[0238]** El anticuerpo parental Ab1 se ha optimizado para la unión a miostatina pro/latente utilizando un enfoque de visualización scFv basado en la levadura. Brevemente, se crearon tres bibliotecas de scFv diferentes para introducir mutaciones puntuales en posiciones de CDR seleccionadas basándose en la frecuencia de aminoácidos observada en repertorios de anticuerpos humanos naturales usando secuenciación profunda de anticuerpos correspondiente a los marcos humanos utilizados por Ab1. Cada biblioteca contenía scFv basado en la secuencia Ab1 con mutaciones puntuales únicas introducidas en cada CDR de manera que cada variante de la cadena pesada o cadena ligera resultante

tendría tres sustituciones totales, una en cada CDR. Las tres bibliotecas se usaron para clasificación y selección basada en FACS para identificar grupos de clones con mayor afinidad de unión por miostatina pro/latente (Figura 23). Se usó la unión directa de clones scFv expresados en levadura para seleccionar anticuerpos para la conversión en IgG de longitud completa expresada en cultivo de células de mamífero.

**[0239]** Muchos de los clones de la mayor afinidad de scFv identificados en la campaña de levadura contenía una sustitución en la posición 28 de la cadena pesada. Para algunos clones, la sustitución de treonina por asparagina dio como resultado la incorporación de un motivo de N-glicosilación no canónico dentro de CDRH1. Como la N-glicosilación dentro de la región variable de un anticuerpo puede ser indeseable, cualquier clon que contuviera un motivo de glicosilación se sustituyó adicionalmente para contener alanina en esta posición.

**[0240]** La cinética de unión a miostatina pro y latente fueron luego evaluados por octeto para cada uno de los constructos optimizados por afinidad y en comparación con la de Ab1 parental (discutido en el Ejemplo 2). Todos los clones mostraron una afinidad de unión significativamente mayor por la miostatina, y se seleccionaron dos, Ab3 y Ab5, basándose en el perfil de unión selectiva sobre GDF11.

#### *Secuencia primaria y esqueleto de anticuerpos de miostatina anti-pro/latente*

**[0241]** A continuación se muestra el alineamiento de secuencia de las regiones variables del Ab 1 parental con sus variantes optimizadas por afinidad. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen utilizando la nomenclatura Kabat (subrayada) e IMGT (negrita). Las sustituciones de Ab1 parental se muestran en texto en minúsculas (a continuación y en las Figuras 24A-24B).

#### A. Región variable de cadena pesada

##### **[0242]**

	MARCO 1	CDR1	MARCO 2
Ab1 parental	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
Ab3	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGfAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
Ab5	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGfAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
	CDR2	MARCO 3	
Ab1 parental	<u>VISYDGS</u> NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
Ab3	<u>VISYDGS</u> iKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
Ab5	<u>VISYDGS</u> nKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
	CDR3	MARCO 4	
Ab1 parental	<u>DLLVRFL</u> EWShYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)		
Ab3	<u>DLLVRFL</u> EWShkYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
Ab5	<u>DLLVRFL</u> EWShkYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28)		

#### B. Región variable de cadena ligera

##### **[0243]**

	MARCO 1	CDR1	FRW2
Ab1 parental	QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
Ab3	QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGS <i>Si</i> SNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
Ab5	QPVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSS <i>NIGg</i> NTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
	CDR2	MARCO 3	
Ab1 parental	<u>SDNQRP</u> SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
Ab3	<u>SDdQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
Ab5	<u>SDdQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
	CDR3	MARCO 4	
Ab1 parental	<u>AAWDDSL</u> NGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)		
Ab3	<u>AAWDeSL</u> NGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)		
Ab5	<u>AAWDeSL</u> NGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)		

*Ingeniería de anticuerpos y la justificación de la selección de isotipos*

**[0244]** En algunas realizaciones, un anticuerpo útil para el bloqueo de la miostatina carecerá de la función efectora. Por tanto, para la construcción humanizada, se seleccionó una región IgG4-Fc. Los anticuerpos del isotipo IgG4 se unen mal al complemento C1q y, por lo tanto, no activan significativamente el complemento. Estos anticuerpos también se unen débilmente a los receptores Fcγ, lo que conduce a una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) ineficaz o ausente.

**[0245]** Para evitar la complicación potencial debido al intercambio de Fab-brazo, que se sabe que ocurre con mAb nativos IgG4, Ab1 y sus variantes fueron diseñadas con la mutación estabilizadora 'Adair' (Angal, 1993), donde la serina 228 (numeración de la UE; residuo 241 numeración de Kabat) se convierte en prolina dando como resultado una secuencia de bisagra similar a IgG1 (CPPCP (SEQ ID NO: 58)). Esta secuencia de Fc diseñada se utiliza en la producción de los anticuerpos aprobados Keytruda, Mylotarg y Tysabri, así como en varios mAb candidatos clínicos actuales en etapa tardía.

*Línea germinal y evaluación de riesgos de inmunogenicidad*

**[0246]** El anticuerpo parental Ab1 y sus variantes son totalmente IgG4 humana (S228P), anticuerpos lambda derivados de presentación en fagos. La porción Fc del anticuerpo contiene una única mutación estabilizadora para prevenir el intercambio de brazos Fab (descrito anteriormente). No se espera que el IgG4 Fc tenga una unión medible a los receptores Fc gamma (véase el Ejemplo 2).

**[0247]** Las regiones marco variables de Ab1 como aisladas de la biblioteca de fagos ingenuos completamente humanos contienen cinco aminoácidos no de línea germinal (ver más abajo y la Figura 22). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen usando la nomenclatura de Kabat y están subrayadas. Los residuos que no pertenecen a la línea germinal se muestran en minúsculas.

*A. Región variable de cadena pesada***[0248]**

```

<-----FR1-----><CDR><-----FR2-----><-----CDR2----->
>
Ab1      QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
IgHV3-30.v...e.....

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLWVSHYYGMDVWGQGTITVTVSS
(SEQ ID NO: 24)
IgHV3-30      ..... (SEQ ID NO: 36)
JH6      .....
(SEQ ID NO: 59)

```

*B. Región variable de la cadena ligera***[0249]**

```

<-----FR1-----><-----CDR1-----><-----FR2-----><CDR2->
Ab1      QPVLTPPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRP
IgLV1-44 .s.....n.....n.....

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      GVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:30)
IgLV1-44 .....a.....e..... (SEQ ID NO: 60)
JL1/2/3      ..... (SEQ ID NO:
61)

```



[0250] Para mitigar el potencial de inmunogenicidad, se crearon variantes adicionales de moléculas Ab1 que sustituyen los residuos de marco de la línea no germinal a sus correspondientes aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, la sustitución perteneciente a Ab1 se puede aplicar de manera similar a Ab3 y Ab4, o cualquier anticuerpo descrito en el presente documento para el que sea apropiada la línea germinal.

[0251] A continuación se muestra un alineamiento de secuencia de regiones variables de Ab1 con sus variantes optimizadas por afinidad. A.) cadena pesada, B.) cadena ligera. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen usando la nomenclatura Kabat (subrayada) e IMGT (negrita). Las sustituciones de las regiones marco presentes en el Ab1 parental se muestran en minúsculas.

#### A. Región variable de cadena pesada

[0252]

	MARCO 1	CDR1	MARCO 2
IgHV3-30	QVQLVESGGGWQPG	SLRLS	CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab1	QiQLVqSGGGWQPG	SLRLS	CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab2	QVQLVESGGGWQPG	SLRLS	CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab4	QVQLVESGGGWQPG	SLRLS	CAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab6	QVQLVESGGGWQPG	SLRLS	CAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
	CDR2	MARCO 3	
IgHV3-30	<u>VISYDGS</u> NKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab1	<u>VISYDGS</u> NKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab2	<u>VISYDGS</u> NKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab4	<u>VISYDGS</u> IKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab6	<u>VISYDGN</u> NKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
	CDR3	MARCO 4	
IgHV3-30	----- (SEQ ID NO: 36)		
Ab1	<u>DLLVRFLEWSHYYGMDV</u> WGQGT	TVTVSS (SEQ ID NO: 24)	
Ab2	<u>DLLVRFLEWSHYYGMDV</u> WGQGT	TVTVSS (SEQ ID NO: 25)	
Ab4	<u>DLLVRFLEWSH</u> KYGM <u>DV</u> WGQGT	TVTVSS (SEQ ID NO: 27)	
Ab6	<u>DLLVRFLEWSH</u> KYGM <u>DV</u> WGQGT	TVTVSS (SEQ ID NO: 29)	

#### B. Región variable de la cadena ligera

[0253]

	MARCO 1	CDR1	MARCO 2
IgLV1-44	QSVLTQPPSASGTPG	QQRVTIS	CGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
Ab1	QpVLTQPPSASGTPG	QQRVTIS	CGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab2	QSVLTQPPSASGTPG	QQRVTIS	CGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab4	QSVLTQPPSASGTPG	QQRVTIS	CGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab6	QSVLTQPPSASGTPG	QQRVTIS	CGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
	CDR2	MARCO 3	
IgLV1-44	<u>SNNQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab1	<u>SDNQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLViSGLQSDDEADYYC		
Ab2	<u>SDNQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab4	<u>SDDQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab6	<u>SDDQRPS</u> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
	CDR3	MARCO 4	
IgLV1-44	----- (SEQ ID NO: 60)		
Ab1	<u>AAWDDSLNGV</u> FGGG	TKLTVL (SEQ ID NO: 30)	
Ab2	<u>AAWDDSLNGV</u> FGGG	TKLTVL (SEQ ID NO: 31)	
Ab4	<u>AAWDESLNGV</u> FGGG	TKLTVL (SEQ ID NO: 33)	
Ab6	<u>AAWDESLNGV</u> FGGG	TKLTVL (SEQ ID NO: 35)	

[0254] Se encontraron que tres de las cinco sustituciones estaban lejos de regiones CDR y por lo tanto no tienen ningún impacto en la unión. Una prolina en la posición 2 de los paquetes de cadenas ligeras contra CDRL3 y la sustitución de la serina de la línea germinal en realidad mejora la unión a la miostatina pro/latente al estabilizar la conformación de CDR.

[0255] El anticuerpo general es mayor que 99% humana (calculado como 100% menos el % de AA no de la línea germinal excluyendo CDRH3). No hay conjugaciones químicas. La secuencia de CDRH2 de cadena pesada contiene un riesgo potencial de isomerización (Asp-Gly) que también está presente en la secuencia de la línea germinal IgHV3-30.

## 5 Ejemplo 2: Caracterización farmacológica

### Ensayos farmacológicos in vitro

10 [0256] Un total de 24 variantes optimizadas de Ab1 se expresaron y se purificaron como IgG4 y se ensayaron para actividad mejorada de unión y funcional. Los cambios en estas moléculas incluyeron mutaciones de germinación en la región variable parental, junto con mutaciones en las CDR que conferían un aumento de la unión a miostatina pro/latente en el cribado de maduración por afinidad (ver Ejemplo 1).

15 [0257] Variantes Ab1 se rastrearon en varios ensayos basados en ELISA diferentes, en donde la unión a la promiostatina y proteínas de miostatina latentes (humana, murina, y cynomolgus) fue re-evaluada, junto con una gran pantalla de proteínas de control negativo para verificar que no se introdujo una unión no específica como resultado de la maduración de la afinidad. Los controles negativos incluyeron proteínas GDF11 (proGDF11, GDF11 latente y GDF11 maduro), proteínas TGF $\beta$  y proteínas de activina (proActivin). Además, se evaluó la poliespecificidad de los anticuerpos (que puede conducir a una eliminación rápida) en una pantalla similar a la publicada anteriormente (Hotzel et al., 2012). Cualquier anticuerpo con interacciones significativas con las proteínas de control negativo o con las partículas de baculovirus en el cribado de poliespecificidad no se consideró además como candidato para un programa de desarrollo.

25 [0258] También se evaluaron las 24 variantes optimizadas de Ab1 en el ensayo de activación de promiostatina para determinar su eficacia funcional, y los valores de CE50 a partir de curvas de respuesta de dosis se compararon con el anticuerpo Ab1 parental. La mayoría de los anticuerpos tenían valores de CE50 equivalentes o mejorados, y algunos mostraban una eficacia reducida en este ensayo. Aquellos con eficacia reducida en el ensayo de actividad fueron excluidos de análisis adicionales.

30 [0259] Tres variantes de Ab1 con unión mejorada a miostatina pro y latente mientras que conservan la especificidad de miostatina pro y latente fueron identificadas. Los datos de unión y de actividad para estas tres variantes y la molécula de Ab1 parental se resumen en las Tablas 4-7, secuencias se muestran en el Ejemplo 1.

Tabla 4: Las características de unión de anticuerpos a proMiostatina humana/cynomolgus/ratón a Ab1 IgG4 parental.

	Ab1			
	Ensayo de actividad – células 293T		Análisis de cinética – Octeto de fortebio	
	CE50 ( $\mu$ M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
Humano	0,274	4,18E+05	1,99E-03	4,76E-09
Cynomolgus	0,5842	3,05E+05	1,75E-03	5,75E-09
Ratón	0,8386	2,37E+05	2,62E-03	1,10E-08

45 Tabla 5: Características de unión de anticuerpos a proMiostatina humana/cynomolgus/ratón a Ab1 IgG4 con los residuos de línea germinal correctos reemplazados (Ab2)) para residuos no de línea germinal

	Ab2			
	Ensayo de actividad – células 293T		Análisis de cinética – Octeto de fortebio	
	CE50 ( $\mu$ M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
Humano	0,248	4,57E+05	1,56E-03	3,42E-09
Cynomolgus	0,6168	2,78E+05	1,41E-03	5,08E-09
Ratón	0,7138	2,35E+05	1,97E-03	8,39E-08

Tabla 6: Características de unión de anticuerpos a proMiostatina humana/cynomolgus/ratón a Ab3 IgG4 que contiene los residuos de línea germinal correctos (Ab4)

	Ab4			
	Ensayo de actividad – células 293T		Análisis de cinética – Octeto de fortebio	
	CE50 (μM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
Humano	0,179	4,98E+05	2,35E-04	4,72E-10
Cynomolgus	0,4451	3,01E+05	2,34E-04	7,76E-10
Ratón	0,4466	2,53E+05	2,72E-04	1,08E-09

Tabla 7: Características de unión de anticuerpos a proMiostatina humana/cynomolgus/ratón a Ab5 IgG4 que contiene los residuos de línea germinal correctos (Ab4)

	Ab6			
	Ensayo de actividad – células 293T		Análisis de cinética – Octeto de fortebio	
	CE50 (μM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
Humano	0,151	5,27E+05	2,51E-04	4,77E-10
Cynomolgus	0,4037	3,50E+05	2,57E-04	7,35E-10
Ratón	0,3068	2,94E+05	2,81E-04	9,54E-10

#### Ensayos de actividad biológica ex vivo e in vivo basados en células

**[0260]** Las variantes optimizadas de Ab1 se evaluaron en el ensayo de activación de GDF8 en un estudio de respuesta a la dosis. En estos experimentos, se preincubó proMiostatina 0,5 μM con cantidades crecientes del artículo de prueba. Después de esta etapa de preincubación, se añadió medio acondicionado de células HEK293 que sobreexpresan las proteasas mT112 y Furina para liberar el factor de crecimiento maduro de la proMiostatina. Después de la incubación a 30°C durante la noche, se añadió el material a células 293T que llevaban un plásmido indicador de luciferasa basado en SMAD y se registró la actividad del material liberado. Los datos de una pantalla se muestran en la Figura 4.

#### Selectividad para miostatina sobre otros miembros de la familia TGFβ

**[0261]** La selectividad de los anticuerpos candidatos también se evaluaron por ambos ensayos de unión y funcionales para verificar la falta de reactividad cruzada con otros miembros de la familia TGFβ. La miostatina humana y el GDF11 comparten un 90% de identidad en el dominio del factor de crecimiento maduro y un 47% de identidad en las regiones prodominio. A partir de los estudios de mapeo de epítomos, se determinó que la molécula Ab1 parental reconoce un epítipo en el prodominio de proMiostatina y miostatina latente porque los ensayos ELISA han demostrado la unión de este anticuerpo a una construcción que consiste en el prodominio de miostatina. Aunque los prodominios de miostatina y GDF11 comparten menos del 50% de identidad, y no esperamos una reactividad cruzada significativa, la especificidad de los anticuerpos principales se evaluó cuidadosamente.

**[0262]** Un ensayo sensible para la detección de interacciones entre los anticuerpos de interés y reactivos de control negativo fue desarrollado. En este ensayo, se inmovilizó proGDF11 biotinilado o proMiostatina biotinilada en una punta de sensor recubierta de estreptavidina ForteBio BLI, que se aplicó a pocillos que contenían 30 μg/ml de anticuerpo. Las interacciones del analito con la proteína inmovilizada en el chip se miden por la magnitud de la respuesta del chip biosensor. La respuesta del biosensor después de 5 minutos de asociación (una señal de saturación para proGDF8) se comparó entre los dos antígenos y se expresó como el porcentaje de respuesta para la unión de GDF8. Todos los anticuerpos tuvieron interacciones mínimas con proGDF 11, en comparación con los eventos de unión robustos medidos para proMiostatina.

Tabla 8: Interacciones con proGDF 11 a altas concentraciones de las moléculas candidatas

	Respuesta de GDF 11, expresada como porcentaje de la respuesta de GDF8
Ab1	1,33%
Ab2	0,81%
Ab4	2,51%
Ab6	2,07%

**[0263]** Los candidatos de anticuerpos también se evaluaron en un ensayo de activación de GDF-11. En este ensayo, se preincubó 50 nM de proGDF 11 con concentraciones crecientes del anticuerpo. Después de la preincubación, se añadió medio acondicionado de células HEK293 que sobreexpresan BMP-1 (una proteasa de la familia toloide) y PCSK5 (un miembro de la familia furina específico para GDF11) para activar proteolíticamente el proGDF 11. Después de la incubación durante la noche a 30°C, se evalúan las mezclas de reacción para la actividad de GDF11 en

una línea celular informadora basada en SMAD. Como se muestra en la Tabla 8, los anticuerpos anti-miostatina no inhiben la activación de proGDF11, mientras que un anticuerpo de control positivo imparte inhibición dependiente de la dosis de la activación de GDF11.

**[0264]** Las afinidades de unión de los candidatos de anticuerpo se determinaron utilizando el sistema de ensayo libre de etiqueta sumergir y leer FortéBio Octet QKE que utiliza la interferometría bio-cap. Los antígenos se inmovilizaron en biosensores (biosensores recubiertos con estreptavidina para proGDF8, proGDF11 y proActivin; acoplamiento directo de amina para todos los demás) en cada experimento y los anticuerpos/construcciones se presentaron en solución a alta concentración (50 mg/ml) para medir las interacciones de unión.

**[0265]** Las afinidades de unión de los anticuerpos se determinaron utilizando el sistema de ensayo libre de etiqueta sumergir y leer FortéBio Octet QKE que utiliza la interferometría bio-cap. ProGDF8 humano, GDF8 latente, proGDF11 y proActivina se biotinilaron e inmovilizaron en biosensores recubiertos de estreptavidina (FortéBio). Los factores de crecimiento maduros se inmovilizaron mediante acoplamiento directo de amina a puntas reactivas de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FortéBio). En cada experimento, los anticuerpos/construcciones se presentaron en solución a una única concentración alta (50 µg/ml) para medir las interacciones de unión. Se adquirieron factores de crecimiento de sistemas de I+D y se produjeron proteínas biotiniladas como se describe.

Tabla 9a: Comparación de anticuerpos para unirse a diferentes formas de varios miembros de la familia de TGFβ.

	<i>Ab2</i>	<i>Ab4</i>	<i>Ab6</i>	<i>Ab1</i>
Pro GDF8	7,35E-09	9,24E-10	8,89E-10	6,23E-09
GDF8 latente	7,84E-09	1,10E-09	1,12E-09	9,06E-09
GDF8 maduro	-	-	-	-
Pro GDF11	-	*1,25E-07	*6,07E-08	-
GDF11 maduro	-	-	-	-
Pro Activina A	-	-	-	-
Activina A madura	-	-	-	-
BMP 9	-	-	-	-
BMP10	-	-	-	-
TGFB1 maduro	-	-	-	-
* Unión no específica.				

**[0266]** Los resultados del estudio de unión al antígeno se resumen en la Tabla 9a. Los experimentos sin unión detectable se indican con un signo menos (-). Hay algunos valores de Kd calculados que se ajustaron a los datos con una respuesta de unión deficiente, que se indica en la tabla como unión no específica débil (\*).

**[0267]** Como la muestra proGDF8 utilizada en la Tabla 9a contenía aproximadamente un 10-15% de GDF8 latente, un experimento separado se utilizó para confirmar unión de antígenos proGDF8 a GDF8 humanos y murinos específicamente. Además, GDF8 cebado, en donde proGDF8 se escinde proteolíticamente tanto por una proproteína convertasa como por una proteasa toloide, también se evaluó para determinar la afinidad de unión a Ab2 y AbMyo. Para estos experimentos, se purificó una preparación homogénea de proGDF8 humano a partir de células 293 integradas establemente cultivadas en presencia de decanoil-RVKR-CMV 30 mM. El GDF8 humano preparado se produjo mediante la escisión in vitro de proGDF8 utilizando medio acondicionado de células que sobreexpresan mT112 y proteasa furina purificada. En los experimentos de unión con estas proteínas, se utilizó 150 nM de Ab2 o AbMyo para saturar los sitios de inmovilización en las puntas de captura de Fc humano (FortéBio), y se evaluó la asociación y disociación del analito 150 nM.

**[0268]** Análisis de afinidades a proteínas murinas de unión también se evaluaron y se reportan en la Tabla 9b. La proteína proGDF8 murina se produjo eliminando todo el GDF8 murino maduro y latente de la muestra mediante selección negativa con un anticuerpo que reconoce estrechamente el GDF8 latente y maduro (AbMyo2). Se utilizaron 50 nM de anticuerpo para saturar una punta de captura anti-Fc humana (FortéBio). Inicialmente, todos los anticuerpos se probaron contra una concentración única de 200 nM de proGDF8 murino, GDF8 latente murino y GDF8 maduro. Si se observó unión, se determinó un valor de Kd inmovilizando el anticuerpo como se describió previamente y usando analito en una titulación de 200 a 0,82 nM mediante diluciones de 3 veces. El Kd se determinó mediante un ajuste global con el software de análisis de datos FortéBio 8.2. Para unirse a la miostatina madura, se acoplaron 5 µg/ml de factor de crecimiento (sistemas de I+D) a puntas de sensor reactivas con amina (FortéBio) en tampón acetato a pH 5. Todos los anticuerpos se probaron inicialmente a 333 nM para determinar la unión a este sensor acoplado a miostatina. Los anticuerpos que mostraron unión se probaron luego en concentraciones que variaban de 333 a 1,37 nM por diluciones de 3 veces. Se utilizó un ajuste global para determinar el Kd de la interacción utilizando el análisis de datos FortéBio 8.2.

Tabla 9b: Comparación de anticuerpos para la unión a diferentes formas de GDF8 humano y murino.

	Ab2	AbMyo
Pro GDF8 humano	2,9 E-09	-
GDF8 latente humano	2,4 S-9	3,87E-10
GDF8 cebado humano	8,66E-09	8,83E-10
GDF8 maduro	-	4,7 E - 11
ProGDF8 murino	2,3 E-09	-
GDF8 latente murino	2,0 E-09	<1 E-12

[0269] Los resultados de un estudio de unión a antígeno se resumen en la Tabla 9b. Los experimentos sin unión detectable se indican con un signo menos (-). Algunos valores, etiquetados como <1 E-12, tenían tasas de disociación muy lentas, lo que hacía que la alta afinidad no pudiera cuantificarse. Sorprendentemente, AbMyo no pudo reconocer el proGDF8 recombinante, que es diferente de los resultados informados en Latres et al 2015, en los que los autores informaron la asociación de AbMyo con proGDF8 en un experimento de inmunoprecipitación del suero de ratones que recibieron la dosis del anticuerpo que podría producir artefactos. Otro resultado sorprendente es la interacción entre Ab2 y GDF8 cebado, un complejo de GDF8 con predominio escindido de toloide. Este resultado es inesperado porque Ab2 bloquea la escisión toloide del predominio y sugiere que la interacción de Ab2 con proGDF8 y GDF8 latente no requiere un sitio de escisión toloide intacto.

#### Evaluación de la funcionalidad de región Fc

[0270] En algunas realizaciones, terapia de miostatina anti-pro/latente implica unirse a una diana soluble (miostatina pro/latente) y la prevención de la activación proteolítica. En algunas realizaciones, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y la fijación del complemento no están implicadas en este proceso. Ab1 y sus variantes relacionadas se diseñaron para contener una región IgG4- Fc. Se entiende que los anticuerpos IgG4 generalmente carecen de función efectora debido a su unión débil a los receptores C1q y Fcγ del componente del complemento.

[0271] Para demostrar la capacidad reducida de la función efectora, Ab1 y anticuerpos relacionados se ensayaron para la unión a CD64 (FcγRI) y C1q por ELISA. A modo de comparación, también se preparó una variante IgG1 de Ab1. En este ensayo, todos los anticuerpos IgG4 mostraron una unión significativamente más débil (de 10 a 20 veces) a CD64 y C1q en comparación con IgG1. Los valores de unión relativos a la CE50 se enumeran en la Tabla 10.

Tabla 10: Afinidades de unión relativas de Ab2 y anticuerpos relacionados con CD64.

Anticuerpo	Isotipo	Unión relativa de CD64 a CE50 (%)	Unión relativa C1q a CE50 (%)
Ab1-G1	IgG1	100	100
Ab1	IgG4 (S228P)	10	ND
Ab2	IgG4 (S228P)	5	8
Ab3	IgG4 (S228P)	5	5
Ab5	IgG4 (S228P)	8	9
No determinado			

[0272] Las afinidades de unión aparentes de Ab1 y sus variantes relacionadas con CD64 y C1q son similares a otros anticuerpos candidatos clínicos IgG4, y se reducen considerablemente en comparación con los anticuerpos del isotipo IgG1. En base a la biología de los anticuerpos IgG4, se concluye por tanto que los anticuerpos de miostatina anti-pro/latente no inducirán una función efectora apreciable *in vivo*.

#### Eficacia en modelos animales

[0273] En base a la caracterización *in vitro*, se eligieron cuatro anticuerpos para ensayar en un estudio *in vivo* (Ab7, Ab1, Ab8 y Ab9). El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de estos cuatro anticuerpos candidatos para modular la masa muscular de los ratones. Cinco (5) grupos, a menudo (10) ratones SCID hembra, recibieron la administración del artículo de prueba mediante inyección intraperitoneal (IP) una vez por semana los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. Antes de la administración del artículo de prueba (día 0), todos los animales se sometieron a una evaluación de la fuerza de agarre. La evaluación de la fuerza de agarre también se realizó el último día del estudio (día 42). El día 0, se extrajo sangre mediante sangrado retroorbital para evaluar el recuento sanguíneo completo (CBC). Después de la dosificación, los animales se evaluaron diariamente para determinar el peso corporal y las observaciones generales de salud. El día 42, después de la evaluación de la fuerza de agarre, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de CO<sub>2</sub> y se extrajo sangre mediante punción cardíaca para la evaluación del hemograma completo. Se recogió sangre adicional para la preparación de plasma. Se aislaron y pesaron varios tejidos. Los músculos recogidos fueron: gastrocnemio, pectoral, sóleo, tríceps, tibial anterior, cuádriceps (recto femoral) y diafragma. Los órganos recolectados fueron: corazón, riñón, bazo, hígado y tejido adiposo blanco inguinal. Todos los tejidos se pesaron y se congelaron rápidamente excepto los músculos gastrocnemio que se fijaron en formalina (pierna 1) y OCT (pierna 2) para análisis histológico.

## Resumen

[0274] Los datos de porcentaje de cambio de peso diario medio para los animales en estudio SCH-02 se muestran en la Figura 6. Los animales de los cinco grupos aumentaron de peso semanalmente. Los animales tratados con el anticuerpo Ab1 tuvieron el mayor aumento de peso corporal (14,6%) como se muestra en la Figura 6. Sólo los animales tratados con Ab1 tuvieron un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje medio de cambio de peso corporal en comparación con los animales en el grupo de control de vehículo (PBS) (Figura 6).

[0275] Los pesos de los músculos disecados se representan gráficamente en las Figuras 7 y 8. Los animales tratados con Ab1 tuvieron aumentos estadísticamente significativos en los pesos de gastrocnemio (Figura 7A) y diafragma (Figura 8B) en comparación con los animales tratados con vehículo (PBS) control, 27,6% y 49,8%, respectivamente. Los músculos adicionales de los animales tratados con Ab1 mostraron aumentos de peso en comparación con el control de PBS, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para los pesos medios de tejido de corazón, bazo, riñón, hígado y tejido adiposo.

## Estudio de respuesta a dosis SCID

[0276] En el estudio *in vivo* (arriba) animales dosificados con Ab1 a 25 mg/kg una vez por semana durante 6 semanas mostraron estadísticamente aumentos significativos en peso corporal y pesos musculares (gastrocnemio y diafragma) en comparación con animales dosificados con el vehículo (PBS). Esta actividad potenciadora del músculo de Ab1 se investigó a continuación con más detalle en un estudio de respuesta a la dosis en ratones SCID. En este estudio, se examinaron si la magnitud del efecto sobre la masa muscular podría aumentarse aumentando la dosis de Ab1 hasta 60 mg/kg/semana y si la magnitud del efecto sobre la masa muscular podría disminuirse disminuyendo la dosis de Ab1 hasta tan solo 2 mg/kg/semana. En este estudio, la actividad de Ab1 se comparó con dos anticuerpos más (Ab8, que se probó originalmente en el estudio descrito anteriormente Ab10).

[0277] Diez (10) grupos de diez (10) ratones SCID hembra recibieron la administración de artículos de prueba por inyección intraperitoneal (IP) (10 ml/kg) dos veces por semana en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24. Las dosis de los artículos de prueba fueron las siguientes: Ab1 (30 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg y 1 mg/kg), Ab10 (10 mg/kg y 3 mg/kg) y Ab8 (10 mg/kg y 3 mg/kg). A los grupos de control se les administró PBS y control de IgG (30 mg/kg). Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 11. Los animales tenían 10 semanas de edad al comienzo del estudio. El peso corporal se midió el día -4 y dos veces por semana durante todo el estudio, correspondiente a los días de dosificación. Los parámetros de composición de la masa corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) se midieron mediante Echo MRI (QNMRI) los días -4, 7, 14, 21 y 28. Treinta (30) días después de la primera dosis de anticuerpo, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> y se extrajo sangre mediante punción cardíaca para la evaluación del hemograma completo y la preparación del plasma. Además, al finalizar el estudio, se aislaron y pesaron varios tejidos. Los músculos recogidos fueron: gastrocnemio, sóleo, tibial anterior, cuádriceps (recto femoral) y diafragma. Se diseccionaron músculos de las patas derecha e izquierda de los ratones del estudio. Para el análisis, se combinaron los pesos de los músculos individuales de ambas piernas y se calculó el peso muscular promedio en gramos. Los otros tejidos recogidos fueron: corazón, riñón, bazo, hígado y tejido adiposo. Todos los tejidos se pesaron y luego se congelaron rápidamente excepto los músculos gastrocnemio que se fijaron en formalina (pierna izquierda) y OCT (pierna derecha) para análisis histológico.

Tabla 11: Diseño del estudio

Grupo de tratamiento	Dosis del artículo de prueba	Nº dosis por semana	Dosis total por semana	Identificaciones de animales
1	Control de PBS	2	0	1-10
2	Control de IgG (30 mg/kg)	2	60 mg/kg/semana	11-20
3	Ab1 (30 mg/kg)	2	60 mg/kg/semana	21-30
4	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	31-40
5	Ab1 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/semana	41-50
6	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	51-60
7	Ab10 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	61-70
8	Ab10 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/semana	71-80
9	Ab8 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	81-90
10	Ab8 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/semana	91-100

[0278] Los datos de cambio porcentual medio de peso y cambio de masa magra porcentual medio para animales tratados con vehículo (PBS), control de IgG y diferentes dosis de Ab1 se muestran en la Figura 9. Los animales tratados con Ab1 a dosis de 20 y 60 mg/kg/semana tuvieron aumentos significativos en el peso corporal el día 28 del estudio en comparación con los animales tratados con control de IgG, 15,3% y 14,4%, respectivamente (Figura 9A). Los cuatro grupos de animales tratados con Ab1 (dosis de 60, 20, 6 y 2 mg/kg/semana) tuvieron aumentos estadísticamente significativos en la masa magra el día 28 del estudio en comparación con los animales tratados con control de IgG, 14,1%, 12,4%, 17,1% y 15,5%, respectivamente (Figura 9B).

**[0279]** Los pesos para cuatro músculos (cuádriceps, gastrocnemio, tibial anterior y diafragma) se representan gráficamente en la Figura. 10. También se diseccionó el músculo sóleo, pero el pequeño tamaño del músculo dio como resultado un conjunto de datos extremadamente variable. Los animales tratados con todas las dosis de Ab1 tuvieron aumentos estadísticamente significativos en los pesos musculares en comparación con los animales de control de IgG (Figura 10). Los cambios porcentuales medios en la masa muscular en comparación con el control de IgG se muestran encima de la barra correspondiente en cada gráfico muscular. Los cambios porcentuales medios de peso para el músculo cuádriceps oscilaron entre el 20,5% para la dosis más alta y el 10,7% para la dosis más baja (Figura 10A). Los cambios porcentuales medios de peso para el músculo gastrocnemio oscilaron entre el 17,7% para la dosis más alta y el 15,9% para la dosis más baja (Figura 10B). Los cambios de peso porcentuales medios para el músculo tibial anterior oscilaron entre el 24,0% para la dosis más alta y el 18,0% para la dosis más baja (Figura 10C). Los cambios de peso porcentuales medios para el músculo diafragma fueron superiores al 30% para todos los grupos de dosis (Figura 10D). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para los pesos medios de tejido de corazón, bazo, riñón, hígado y tejido adiposo.

#### *Tratamiento Ab1 en un modelo de atrofia muscular inducida por dexametasona*

**[0280]** Dada la capacidad del anticuerpo de anti-miostatina Ab1 para construir masa muscular en ratones SCID saludable, se determinó si el tratamiento Ab1 también podría proteger a los animales de los tratamientos que inducen la atrofia muscular. Se estableció un modelo de atrofia muscular inducida por corticosteroides tratando a los animales durante dos semanas con dexametasona en el agua de bebida. La dosis elegida (2,5 mg/kg/día) fue capaz de inducir disminuciones significativas en la masa corporal magra y la masa de los músculos individuales de las patas traseras. En el siguiente experimento, los animales fueron tratados con diferentes dosis de Ab1 para determinar si podía proteger a los animales de esta atrofia muscular inducida por dexametasona.

**[0281]** En este estudio, ocho (8) grupos de diez (10) ratones macho (C57BL/6) se inscribieron en el estudio en 13,5 semanas de edad. A partir del día 0 del estudio, los ratones recibieron agua potable normal (grupos 1-4) o agua que contenía dexametasona (grupos 5-8). Los artículos de prueba se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) (10 ml/kg) dos veces por semana los días 0, 3, 7 y 10. Los artículos de prueba y las dosis fueron las siguientes: PBS (grupos 1 y 5), 10 mg/kg IgG Ctl (grupos 2 y 6), 10 mg/kg Ab1 (grupos 3 y 7) y 1 mg/kg Ab1 (grupos 4 y 8). Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 12. El peso corporal se midió al menos dos veces por semana durante todo el estudio. Los parámetros de composición de la masa corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) se midieron mediante Echo MRI (QNM) los días -1, 6 y 13. Catorce (14) días después de la primera dosis de anticuerpo, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de CO<sub>2</sub> y se extrajo sangre mediante punción cardíaca para la preparación de plasma. Además, al finalizar el estudio, se aislaron y pesaron varios tejidos. Los músculos recogidos fueron: gastrocnemio, sóleo, tibial anterior, cuádriceps (recto femoral) y diafragma. Se diseccionaron músculos de las patas derecha e izquierda de los ratones del estudio. Para el análisis, se combinaron los pesos de los músculos individuales de ambas piernas y se calculó el peso muscular promedio en gramos. Los otros tejidos recolectados fueron: corazón, riñón, bazo, hígado y tejido adiposo. Todos los tejidos se pesaron y luego se congelaron rápidamente excepto los músculos gastrocnemio que se fijaron en formalina (pierna izquierda) y OCT (pierna derecha) para análisis histológico.

Tabla 12: Grupos de tratamiento para el estudio del modelo de atrofia inducida por dexametazona

Grupo de tratamiento	Dexametasona en el agua potable	Dosis del artículo de prueba	Nº dosis por semana	Dosis total por semana	Identificaciones de animales
1	ninguno	Control de PBS	2	0	1-10
2	ninguno	Control de IgG (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	11-20
3	ninguno	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	21-30
4	ninguno	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	31-40
5	2,5 mg/kg/día	Control de PBS	2	0	51-60
6	2,5 mg/kg/día	Control de IgG (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	61-70
7	2,5 mg/kg/día	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	71-80
8	2,5 mg/kg/día	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	81-90

**[0282]** En este experimento se determinó si el tratamiento de ratones con anticuerpo de anti-miostatina Ab1 podría proteger a los animales de la atrofia muscular inducida por corticosteroides. Durante el estudio, el peso corporal se midió dos veces por semana y la masa magra mediante QNM en los días -1, 6 y 13. El porcentaje medio de cambio de peso y el porcentaje medio de cambio de masa magra de los datos de los animales en el grupo de control no enfermo (grupo 1) y los grupos tratados con dexametasona (grupos 5-8) se muestran en la Figura 11. No hubo diferencias significativas en el cambio porcentual medio del peso corporal entre ninguno de estos grupos de tratamiento el día 14 (Figura 11A). El tratamiento de ratones con dexametasona durante dos semanas condujo a una disminución significativa de la masa corporal magra (grupos 5 y 6) en comparación con un grupo de control (grupo 1) que recibió agua potable normal (Figura 11B). Sin embargo, los ratones tratados con dexametasona y el anticuerpo Ab1 a 20 mg/kg/semana (grupo 7) no mostraron diferencias significativas en el cambio porcentual en la masa corporal magra el día 14 del estudio en comparación con el grupo de control (grupo 1). Los animales tratados con Ab1 a 20

mg/kg/semana, pero no 2 mg/kg/semana, mostraron una diferencia significativa en el cambio porcentual en la masa corporal magra el día 14, en comparación con cualquiera de los grupos de control tratados con dexametasona (grupos 5 y 6).

**[0283]** Al final del tratamiento de dos semanas con dexametasona y los artículos de prueba, los músculos individuales se diseccionaron y se pesaron. Los datos de peso para dos músculos (gastrocnemio y cuádriceps) se representan en las Figuras 12A-12B. Los animales que recibieron dexametasona a través del agua de bebida y también recibieron PBS o anticuerpo de control IgG mostraron una atrofia significativa en los músculos gastrocnemio y cuádriceps (grupos 5 y 6) en comparación con el grupo de control no enfermo (grupo 1). Los animales tratados con dexametasona y Ab1 a 20 mg/kg/semana (grupo 7), pero no 2 mg/kg/semana, mostraron una diferencia significativa en el peso muscular en comparación con cualquiera de los grupos de control tratados con dexametasona (grupos 5 y 6). Además, los ratones tratados tanto con dexametasona como con el anticuerpo Ab1 a 20 mg/kg/semana (grupo 7) no mostraron diferencias significativas en los pesos de los gastrocnemios y cuádriceps en comparación con el grupo de control no enfermo (grupo 1). La diferencia porcentual media en el peso muscular de cada grupo en comparación con el peso muscular medio del grupo de control (grupo 1, PBS y agua) se muestra en las Figuras 12C-12D. Las disminuciones porcentuales de la masa de gastrocnemio inducidas por el tratamiento con dexametasona en los grupos de PBS e IgG Ctl fueron del 16,5% y el 18,9%, respectivamente. En contraste, los animales tratados tanto con dexametasona como con 20 mg/kg/semana de Ab1 solo tuvieron una disminución del 4,0% en la masa del músculo gastrocnemio que no fue estadísticamente diferente del grupo de control no enfermo (grupo 1). Mientras que los animales tratados tanto con dexametasona como con 2 mg/kg/semana de Ab1 (grupo 8) solo tuvieron una disminución del 10% en la masa del músculo gastrocnemio, la disminución de la masa muscular para este grupo no fue estadísticamente diferente a las disminuciones para los grupos de control de PBS e IgG. (grupos 5 y 6). Se observaron resultados similares para el músculo cuádriceps (Figura 12D).

#### *Tratamiento con Ab1 en un modelo de atrofia muscular inducida por yeso*

**[0284]** Dada la capacidad del anticuerpo anti-miostatina Ab1 para desarrollar masa muscular en ratones SCID sanos, se investigó si el tratamiento con Ab1 también podría proteger a los animales de tratamientos que inducen atrofia muscular. Se estableció un modelo de atrofia por desuso lanzando la pata derecha de los ratones durante dos semanas. Colocar la pierna derecha con el pie en una posición de flexión plantar durante este período de tiempo pudo inducir disminuciones significativas en la masa de los músculos individuales de las extremidades posteriores. En el siguiente experimento, los animales se trataron con diferentes dosis de Ab1 para determinar hasta qué punto protege animales de esta atrofia muscular inducida por yeso.

Tabla 13: Los grupos de tratamiento para el estudio modelo de atrofia inducida por colada

Grupo de tratamiento	Yeso	Dosis del artículo de prueba	Nº dosis por semana	Dosis total por semana	Identificaciones de animales
1	Sin yeso	Control de PBS	2	0	1-10
2	Sin yeso	Control de IgG (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	11-20
3	Sin yeso	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	21-30
4	Sin yeso	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	31-40
5	Yeso	Control de PBS	2	0	51-60
6	Yeso	Control de IgG (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	61-70
7	Yeso	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	71-80
8	Yeso	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	81-90

**[0285]** En este estudio, ocho (8) grupos de diez (10) ratones macho (C57BL/6) se inscribieron en el estudio de 14,5 semanas de edad. A partir del día 0 del estudio, se colocó a los ratones bajo anestesia y se aplicó un yeso en la extremidad posterior derecha con el pie en una posición de flexión plantar (grupos 5-8). Los grupos de control (grupos 1-4) también se colocaron bajo anestesia pero no se colocó yeso en la extremidad trasera. Los artículos de prueba se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) (10 ml/kg) dos veces por semana los días 0, 3, 7 y 10. Los artículos de prueba y las dosis fueron las siguientes: PBS (grupos 1 y 5), 10 mg/kg IgG Ctl (grupos 2 y 6), 10 mg/kg Ab1 (grupos 3 y 7) y 1 mg/kg Ab1 (grupos 4 y 8). Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 13. Se midió el peso corporal al menos dos veces por semana durante todo el estudio. Los parámetros de composición de la masa corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) se midieron mediante Echo MRI (QNMRI) los días -1, 7 y 14. Catorce (14) días después de la primera dosis de anticuerpo, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de CO<sub>2</sub> y se extrajo sangre mediante punción cardíaca para la preparación de plasma.

**[0286]** Además, varios tejidos fueron aislados y se pesaron. Los músculos recogidos fueron: gastrocnemio, sóleo, plantar, tibial anterior y cuádriceps (recto femoral). Para el análisis se recogieron los pesos de los músculos individuales de la pata



trasera derecha de los animales. Los otros tejidos recogidos fueron: corazón, adiposo y bazo. Todos los tejidos se pesaron y luego se congelaron rápidamente excepto los músculos gastrocnemio que se fijaron en formalina para análisis histológico.

## 5 Resumen

**[0287]** En este experimento, se probó si el tratamiento de los ratones con el anticuerpo de anti-miostatina Ab1 podría proteger a los ratones de atrofia por desuso muscular inducida por colada de la extremidad posterior derecha. Durante el estudio, se midió el peso corporal dos veces por semana y la masa magra se midió mediante QNMR los días -1, 7 y 14. El porcentaje medio de cambio de peso y el porcentaje medio de cambio de masa magra de los animales del grupo de control no enfermo (grupo 1) y los grupos que se enyesaron durante dos semanas (grupos 5-8) se muestran en la Figura 13. El moldeado de la extremidad trasera derecha no tuvo ningún efecto negativo sobre la ganancia de peso corporal (Figura 13A) y cualquier diferencia en la masa magra de los grupos no fue significativa (Figura 13B).

**[0288]** Al final de las dos semanas de estudio, músculos individuales se diseccionaron y se pesaron. Los datos de peso para dos músculos (gastrocnemio y cuádriceps) se representan en las Figuras 14A-14B). Los animales que tenían la pierna enyesada y también recibieron PBS o anticuerpo de control IgG mostraron atrofia significativa en los músculos gastrocnemio y cuádriceps (grupos 5 y 6) en comparación con el grupo de control sin yeso (grupo 1). Los animales que fueron enyesados y dosificados con Ab1 a 20 mg/kg/semana (grupo 7), pero no 2 mg/kg/semana, mostraron una diferencia significativa en los pesos musculares en comparación con cualquiera de los grupos de control enyesados (grupos 5 y 6). Además, los ratones enyesados que fueron tratados con el anticuerpo Ab1 a 20 mg/kg/semana (grupo 7) no mostraron diferencias significativas en los pesos de los gastrocnemios y cuádriceps en comparación con el grupo de control sin yesos (grupo 1). La diferencia porcentual media en el peso muscular de cada grupo en comparación con el peso muscular medio del grupo de control sin yeso (grupo 1) se muestra en las Figuras 14C-14D. Las disminuciones porcentuales en la masa de gastrocnemio inducidas por el yeso en los grupos PBS e IgG Ctl fueron 22,8% y 23,5%, respectivamente. Por el contrario, los ratones enyesados que fueron tratados con 20 mg/kg/semana de Ab1 solo tuvieron una disminución del 10,0% en la masa del músculo gastrocnemio. Se encontró que esta diferencia era estadísticamente diferente de los grupos de control moldeados que recibieron PBS y anticuerpo IgG Ctl (grupo 5 y 6). La disminución de la masa muscular para los ratones con yeso tratados con 2 mg/kg/semana de Ab1 no fue estadísticamente diferente de las disminuciones para los grupos de control de PBS e IgG (grupos 5 y 6). Se observaron resultados similares para el músculo cuádriceps (Figura 14D).

**[0289]** La estructura de dominio de proMiostatina y Miostatina latente, con sitios de escisión de proteasa indicados, se muestra en la FIG 16A. En la Figura 16B se muestra un ejemplo de proMiostatina escindida parcialmente por proproteína convertasa en un gel SDS PAGE. En condiciones reductoras, las bandas de proteínas consistían en el monómero de proMiostatina (~ 50 kD), predominio (~ 37 kD) y factor de crecimiento (12,5 kD).

**[0290]** El Ab1 se une específicamente a la proMiostatina y la Miostatina latente, sin que se observe unión a otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ , más notablemente las formas correspondientes de GDF11 (Figura 17A). Se administró Ab1 a una concentración alta (50 ug/ml) a puntas Forte-Bio BLI recubiertas con el antígeno indicado y se midieron las velocidades de activación y desactivación para obtener un valor de Kd aproximado. La magnitud de la respuesta del biosensor, que indica un evento de unión, se representa gráficamente mediante barras negras y el Kd calculado se indica en naranja. Además, Ab1 bloquea la activación de proMiostatina, pero no proGDF11 (Figura 17B).

## 45 Estudio de respuesta a dosis SCID con Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6

**[0291]** Los estudios anteriores *in vivo* con Ab1 han demostrado que Ab1 puede aumentar la masa muscular en animales sanos, así como prevenir la pérdida de músculo en modelos de ratón de la atrofia muscular (dexametasona y atrofia inducida por yeso). Los esfuerzos de ingeniería de anticuerpos identificaron tres anticuerpos con características *in vitro* que eran mejores que Ab1. En este estudio, en ratones SCID, se comparó la actividad *in vivo* de estos anticuerpos a tres dosis diferentes con la actividad ya establecida de Ab1.

**[0292]** Catorce (14) grupos de ocho (8) ratones SCID hembra recibieron administración de artículo de ensayo por inyección intraperitoneal (IP) (10 ml/kg) dos veces por semana en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24. Las dosis de los artículos de prueba fueron las siguientes: Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 se administraron en 3 dosis diferentes (10 mg/kg, 1 mg/kg y 0,25 mg/kg) y el anticuerpo IgG-Ct1 se administró a 10 mg/kg. Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 14. Los animales tenían 10 semanas de edad al comienzo del estudio. El peso corporal se midió dos veces por semana durante todo el estudio, correspondiente a los días de administración. Los parámetros de composición de la masa corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) se midieron mediante Echo MRI (QNMR) los días 0, 7, 14, 21 y 28. Veintiocho (28) días después de la primera dosis de anticuerpo, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> y la sangre se extrajo mediante punción cardíaca para la preparación de plasma.

**[0293]** Además, varios tejidos fueron aislados y se pesaron. Los músculos recogidos fueron: gastrocnemio, sóleo, tibial anterior, cuádriceps (recto femoral), extensor largo de los dedos y diafragma. Se diseccionaron músculos de las patas derecha e izquierda de los ratones del estudio. Para el análisis, se combinaron los pesos de los músculos individuales de ambas piernas y se calculó el peso muscular promedio en gramos. Los otros tejidos recogidos fueron: corazón, riñón,

bazo, hígado y tejido adiposo. Todos los tejidos se pesaron y luego se congelaron rápidamente excepto los músculos gastrocnemio izquierdo que se fijaron en formalina para el análisis histológico.

Tabla 14: Grupos de tratamiento para el estudio del modelo de respuesta a la dosis

Grupo de tratamiento	Dosis del artículo de prueba	Nº dosis por semana	Dosis total por semana	Identificaciones de animales
1	Control de PBS	2	0	1-8
2	Control de IgG (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	9-16
3	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	17-24
4	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	25-32
5	Ab1 (0,25 mg/kg)	2	0,5 mg/kg/semana	33-40
6	Ab2 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	41-48
7	Ab2 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	49-56
8	Ab2 (0,25 mg/kg)	2	0,5 mg/kg/semana	57-64
9	Ab4 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	65-72
10	Ab4 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	73-80
11	Ab4 (0,25 mg/kg)	2	0,5 mg/kg/semana	81-88
12	Ab6 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/semana	89-96
13	Ab6 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/semana	97-104
14	Ab6 (0,25 mg/kg)	2	0,5 mg/kg/semana	105-112

**[0294]** Datos de cambios porcentuales medios de masa magra (desde el día 0) para animales tratados con vehículo (PBS), control de IgG y dosis diferentes de Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 se muestran en la Figura 15. Los animales tratados con Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 a un nivel de dosis de 20 mg/kg/semana tuvieron aumentos significativos en la masa magra el día 21 y el día 28 del estudio en comparación con los animales tratados con el control de IgG y el vehículo (PBS). Los animales tratados con Ab1 y Ab2 a un nivel de dosis de 2 mg/kg/semana también tuvieron cambios significativos en la masa magra en los días 21 y 28 del estudio. No hubo cambios significativos en la masa magra de los grupos de control para los animales tratados con Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 a un nivel de dosis de 0,5 mg/kg/semana.

**[0295]** Al final del estudio (día 28) se recogieron y pesaron los músculos. Los pesos de los músculos cuádriceps (recto femoral) y gastrocnemio se representan en la Figura 18A y 18B. Los animales tratados con Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 a un nivel de dosis de 20 mg/kg/semana tuvieron aumentos significativos en los pesos de los músculos gastrocnemio y cuádriceps (recto femoral) en comparación con los animales tratados con vehículo (PBS). Los animales tratados con Ab2 y Ab4 a un nivel de dosis de 2 mg/kg/semana también tuvieron cambios significativos en el peso del músculo gastrocnemio. Los animales tratados con Ab2 a un nivel de dosis de 2 mg/kg/semana también tuvieron cambios significativos en el peso del músculo cuádriceps (recto femoral). No hubo cambios significativos en la masa muscular de los grupos de control para los animales tratados con Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 a un nivel de dosis de 0,5 mg/kg/semana. Las diferencias porcentuales en los pesos de los músculos gastrocnemio y cuádriceps (recto femoral) (en comparación con el grupo de vehículo) de los animales tratados con diferentes dosis de Ab1, Ab2, Ab4 y Ab6 se enumeran en la Figura 18C.

#### *Estudio de duración de la acción con Ab1 en ratones SCID*

**[0296]** Se ensayó la capacidad de Ab1 para aumentar la masa magra en ratones SCID después de una dosis única y después de 3 dosis semanales. Siete (7) grupos de ocho (8) ratones SCID hembra recibieron la administración del artículo de prueba mediante inyección intraperitoneal (IP) (10 ml/kg) una vez en el día 0 (grupos 1-4) o una vez por semana los días 0, 7 y 14 (grupos 5-7). Véase la Tabla 15. Los anticuerpos (control de IgG, Ab1 y AbMyo) se dosificaron a 10 mg/kg. Los animales tenían de 10 a 11 semanas al comienzo del estudio. El peso corporal se midió dos veces por semana durante todo el estudio, correspondiente a los días de administración. Los parámetros de composición de la masa corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) se midieron mediante Echo MRI (QNM) los días 0, 7, 14 y 21.

Tabla 15: Grupos de tratamiento y frecuencia de administración.

Grupo de tratamiento	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosificación
1	Control de PBS	0	Una vez
2	CTL de IgG	10	Una vez
3	Ab1	10	Una vez
4	AbMyo	10	Una vez
5	CTL de IgG	10	Una vez a la semana
6	Ab1	10	Una vez a la semana
7	AbMyo	10	Una vez a la semana

**[0297]** Datos de cambio de masa magra porcentual medio para animales tratados con vehículo (PBS), control de IgG, Ab1, AbMyo se muestran en la Figura 19. Los datos se expresan como cambio en la masa magra desde el día 0 del estudio. A los 21 días después de una dosis única de artículo de prueba, los animales tratados con Ab1 (grupo 3) tuvieron aumentos significativos en la masa magra (en comparación con los animales de control IgG, grupo 1) que fueron indistinguibles de los cambios de masa magra después de 3 dosis de Ab1 (grupo 6). Estos cambios en la masa magra también fueron comparables a los cambios observados en animales tratados con una sola dosis (grupo 4) o con 3 dosis semanales (grupo 7) de AbMyo.

#### *Ejemplo 3: Química/Ciencias Farmacéuticas*

**[0298]** Ab2 es un anticuerpo monoclonal humanizado del subtipo IgG4 con prolina sustituido por serina en la posición 228. Esto genera una secuencia bisagra de tipo IgG1 y minimiza la formación incompleta de puentes disulfuro entre cadenas, que es característica de IgG4. La secuencia de aminoácidos completa de las cadenas pesada y ligera de Ab2 se muestra a continuación. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas. Secuencia NST en negrita: sitio de secuencia consenso de glicosilación ligada a N; Las secuencias de DP en negrita son sitios potenciales de escisión; Las secuencias NX en negrita, en las que X puede ser S, T o G son sitios potenciales de desamidación; Las secuencias DX en negrita, en las que X puede ser G, S, T o SDG son sitios potenciales de isomerización; las metioninas en negrita son sitios potenciales de oxidación de metionina; Q en negrita es un ácido piroglutámico N-terminal esperado (Figuras 21A-21B).

**[0299]** El modelado molecular de Ab1 identificó varios sitios potenciales de modificaciones post-traduccionales. Dos asparaginas de la cadena ligera y siete de la cadena pesada son susceptibles de desamidación. Dos de estos residuos se encuentran dentro de las regiones CDR de la cadena pesada.

**[0300]** IgG4 mAbs nativos pueden tener formación incompleta de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas, con las dos medias moléculas (cada una que contiene una cadena pesada y una ligera) mantenidas en la estructura del anticuerpo intacto por interacciones no covalentes. Las moléculas de IgG4 pueden ser propensas al intercambio de semimoléculas *in vitro* e *in vivo*, y el nivel de semimoléculas debe ser constante en todos los lotes de fabricación. La sustitución de Ser por Pro en la columna vertebral de la estructura de IgG4 da como resultado una secuencia de bisagra similar a IgG1, lo que permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas y estabiliza notablemente la estructura del anticuerpo. La integridad y estabilidad de la región de bisagra se monitorea durante el desarrollo con caracterización extendida, utilizando ensayos como electroforesis capilar no reductora y cuantificación de sulfhidrilos libres. El potencial de intercambio de cadenas se controla *in vivo*.

#### *Resumen*

**[0301]** Un anticuerpo específico a miostatina pro/latente que bloquea la activación de promiostatina y/o miostatina latente se proporciona en esta memoria. La administración de este anticuerpo que bloquea la activación a ratones sanos aumenta la masa corporal magra y el tamaño de los músculos, y solo se necesita una dosis única para mantener el efecto de mejora muscular durante un período de 1 mes. Además, la administración de anticuerpos protege a los ratones sanos de la atrofia muscular en dos modelos separados de atrofia muscular. Los datos demuestran que el bloqueo de la activación de la miostatina promueve un crecimiento muscular robusto y previene la atrofia muscular *in vivo*, y representa un mecanismo alternativo para las intervenciones terapéuticas del desgaste muscular.

#### *Ejemplo 4: Análisis de miostatina pro y latente en la atrofia muscular*

**[0302]** Se llevaron a cabo transferencias Western para determinar la presencia de miostatina pro y latente en el tejido muscular y en la circulación durante la atrofia muscular, así como durante las condiciones normales. Un modelo estándar de atrofia muscular implica el tratamiento de ratones con 2,5 mg/kg/semana de dexametasona (dosificado en agua de bebida) y se recogieron músculo y plasma después de 2 semanas de tratamiento. Este modelo conduce regularmente a una disminución del 15-25% en la masa muscular durante el curso del tratamiento. El músculo de control y el plasma se recogieron al mismo tiempo de ratones no tratados con dexametasona. Los músculos recto femoral, tibial anterior y sóleo se disecaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que estén listos para su uso. Los lisados musculares se generaron mediante pulverización, seguida de lisis en tampón T-PER complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. El plasma se recogió mediante métodos estándar y se almacenó a -80°C.

**[0303]** Múltiples muestras que contienen concentraciones iguales de proteína se separaron mediante geles de PAGE y transferencia Western sobre una membrana de PVDF. Para los lisados de músculo, se cargaron 10-50 ng de proteína total en el gel. El plasma se diluyó 1:10 en PBS y se cargaron 10 µl de cada muestra en el gel. Como patrones de tamaño, también se cargaron en el gel 0,1-1 ng pro recombinante y/o miostatina latente. La identificación de la proteína miostatina se logró usando un anticuerpo que reconoce el prodominio de miostatina (AF1539, R&D Systems). Este análisis muestra que la proMiostatina es la forma predominante en el músculo, mientras que la Miostatina latente es la forma primaria en el plasma (Figura 25). Además, se demostró que, en ratones con atrofia muscular inducida por dexametasona, la proMiostatina aumenta en el tejido muscular, mientras que la miostatina latente disminuye en el plasma.

**[0304]** Para confirmar estos resultados, las transferencias de Western se repitieron utilizando el marcaje fluorescente y detección (Azure Biosystems). Se cuantificaron los niveles relativos de cada una de las formas de miostatina en plasma y en los músculos recto femoral y tibial anterior de ratones normales y tratados con dexametasona. Estos datos confirman los resultados descritos anteriormente, que muestran un aumento de 2 a 2,5 veces en la proMiostatina en ambos músculos y una disminución de 2,3 veces en la miostatina latente en plasma (Figura 26).

**[0305]** En base a estos datos, se proporciona un modelo para el "flujo" de miostatina en músculos normales y enfermos. Como se demostró, en el músculo normal (Figura 28A), la proMiostatina se produce en el músculo y se convierte en miostatina latente a través de la escisión por la proteasa Furina, que puede ocurrir dentro o fuera de la célula (Anderson et al., 2008). Luego, una fracción de la miostatina latente en el músculo se libera a la circulación, formando una reserva circulante de miostatina latente. En la atrofia muscular, se produce un aumento del factor de crecimiento activo de miostatina, lo que conduce a la atrofia muscular. Se cree que este aumento está causado por la regulación positiva de los niveles de proMiostatina en el músculo y la conversión aumentada de miostatina latente en el factor de crecimiento activo (Figura 28B). Los datos descritos aquí apoyan directamente el primer paso de este modelo, que muestra un aumento de la proMiostatina en el músculo. Los datos también apoyan el segundo paso, ya que se observó una disminución de la masa muscular en los ratones tratados con dexametasona, lo que indica un aumento de la producción de miostatina madura, sin un aumento concomitante de la miostatina latente en el músculo. En consecuencia, el nivel de miostatina en plasma disminuyó, lo que sugiere un aumento de la conversión a miostatina madura.

#### *Ejemplo 5: Inmunoprecipitación a partir de suero murino y el tejido muscular*

**[0306]** Las inmunoprecipitaciones se realizaron para determinar la presencia de promiostatina en circulación, y para investigar la unión de Ab2 y AbMyo a los precursores de miostatina endógena en suero y el músculo. Ab2 reconoce la forma principal de miostatina en el músculo. Los resultados mostrados en la Figura 27 demuestran que un conjunto de proMiostatina sérica precipita con Ab2, lo que sugiere que hay proMiostatina extracelular presente *in vivo*. Además de unirse a la proMiostatina, la miostatina latente y otras formas parcialmente procesadas de miostatina en suero, el Ab2 inmunoprecipitó la proMiostatina a partir de extractos musculares. Por el contrario, AbMyo se unió eficazmente a la miostatina latente y a los precursores parcialmente procesados en el suero, sin interacciones detectables con la proMiostatina en el músculo. Dado que el músculo es el sitio donde se produce la señalización de la miostatina, esto podría proporcionar importantes ventajas al mecanismo de acción de Ab2.

**[0307]** El lisado de músculo homogeneizado se preparó como sigue: cuádriceps de ratón congelados se pulverizaron utilizando un pulverizador criopreparación (Covaris, Woburn MA). A continuación, el músculo pulverizado se resuspendió a una concentración de 50 mg/ml en tampón M-Per (ThermoFisher Scientific) con 1x Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail sin EDTA (ThermoFisher Scientific). El tejido se trituró con una mano de mortero de plástico (Bio-Plas Cat # 4030-PB) y se homogeneizó aún más con pipeteo repetido con una punta de pipeta cortada. A continuación, las muestras de músculo se incubaron durante 30 minutos a 4°C con rotación de extremo a extremo. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 16.100 g durante 10 minutos para sedimentar la fracción insoluble. La fracción soluble se aspiró y se utilizó en experimentos posteriores.

**[0308]** Para la inmunoprecipitación, los anticuerpos Ab2, IgG Ctl, o AbMyo se conjugaron covalentemente a perlas de agarosa utilizando el Thermo Scientific Pierce™ Co-immunoprecipitation Kit de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se conjugaron 75 µg de cada anticuerpo con 50 µl de suspensión de perlas y se utilizaron 30 µg de anticuerpo en cada inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se realizó contra 3 ml de suero de ratón normal combinado (Bioreclamation) o 1,05 ml de cuádriceps de ratón soluble homogeneizado preparado como se describió anteriormente. Las perlas y las muestras conjugadas con anticuerpo se incubaron a 4°C con balanceo de un extremo a otro durante la noche. Después de la incubación, las perlas se recuperaron pasando todo el volumen de la muestra a través de los filtros giratorios incluidos en el kit de inmunoprecipitación conjunta utilizando el colector de vacío QIAvac 24 Plus. (Qiagen) Las perlas se lavaron luego 3x con 200 µl de tampón de lisis/lavado IP, y una vez con 100 µl de tampón acondicionador 1x según las especificaciones del kit. Las eluciones se realizaron con 50 µl de tampón de elución durante cinco minutos y luego se mezclaron con 5 µl de Tris 1M, pH 9,5 en el tubo de recogida.

**[0309]** Las especies de miostatina reducidas por los anticuerpos de prueba se visualizaron por transferencia de Western utilizando AF1539, (R&D systems) ab124721, (Abcam) Alexa Fluor® 680 AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L), (Jackson ImmunoResearch) y IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) (LI-COR Biosciences) Thermo Scientific. Se utilizó tampón de bloqueo SEA BLOCK para las incubaciones de anticuerpos primarios y de bloqueo.

#### *Ejemplo 6: El aumento de la masa muscular y la expresión alterada de proteína miostatina en ratas tratadas con Ab2*

##### **Diseño del estudio**

**[0310]** A ratas hembra Sprague-Dawley de siete a ocho semanas de edad se les administró una sola dosis intravenosa de cualquiera de Ab2 (10 mg/kg), un anticuerpo de control IgG humano no funcional (10 mg/kg) o un volumen equivalente de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Durante el curso del estudio, se recogió suero de 3 ratas por grupo a las 4 horas, 48 horas, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la dosificación. La recolección se realizó mediante métodos estándar y las muestras se almacenaron a -80°C. La masa magra se midió mediante resonancia magnética

nuclear cuantitativa (qNMR) al inicio (antes de la dosificación del día 0) y en los días 7, 14, 21 y 28 (8 ratas/grupo) y los músculos esqueléticos (recto femoral, tibial anterior y sóleo) se recogieron al final del estudio (día 28), se pesaron y se congelaron súbitamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C.

## 5 Resultados

[0311] La exposición al fármaco se midió en muestras de suero usando un ELISA específico para IgG humana con cantidades conocidas de cada medicamento que se usa como patrón de referencia. Como se muestra en la Figura 29, 4 horas después de la inyección, tanto el Ab2 como el anticuerpo de control IgG se detectan en suero de rata. A medida que avanza el estudio, Ab2 presenta niveles elevados de fármaco circulante en comparación con el control de IgG, con un promedio de 17,1 mg/ml de fármaco en suero al final del estudio.

[0312] Efectos farmacodinámicos de tratamiento Ab2 fueron evaluados tanto por la medición de la masa magra (por qNMR) durante el curso del estudio y mediante la determinación de los pesos de músculo disecado al final del estudio. La Figura 30A muestra mediciones de masa magra durante el transcurso del estudio, donde las ratas tratadas con Ab2 demuestran un claro aumento en la masa magra en comparación con las ratas tratadas con PBS o con el anticuerpo de control IgG humano. La masa muscular se midió recolectando y pesando los músculos esqueléticos completos al final del estudio (28 días). Como se muestra en la Figura 30B, las ratas tratadas con Ab2 muestran un aumento del 14% y del 11% en las masas de los músculos recto femoral y tibial anterior, respectivamente. Juntos, estos datos indican que el tratamiento de ratas con una sola dosis de Ab2 conduce a aumentos duraderos de la masa muscular.

[0313] Se determinaron los niveles relativos de miostatina pro y latente mediante transferencia Western cuantitativa de muestras de lisado muscular o suero. Se generaron lisados musculares a partir de muestras musculares congeladas instantáneamente mediante pulverización, seguido de lisis en tampón T-PER complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después de la lisis, las muestras que contenían concentraciones iguales de proteína se separaron mediante geles PAGE y se transfirieron por transferencia Western a una membrana de PVDF de baja fluorescencia. Para los lisados de músculo, se cargaron 10-50 ng de proteína total en el gel. El plasma se diluyó 1:10 en PBS y se cargaron 10 µl de cada muestra en el gel. Como patrones de tamaño, también se cargaron en el gel 0,1-1 ng pro miostatina pro y/o latente recombinante. La identificación de la proteína de miostatina se realizó usando un anticuerpo que reconoce el prodominio de miostatina latente (AF1539, R&D Systems), seguido por la detección con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Para todos los análisis de transferencia Western, se analizaron un mínimo de tres muestras por grupo.

[0314] El tratamiento con Ab2 aumenta los niveles de miostatina latente en suero de rata en ~ 20 veces (Figura 31A) en comparación con las ratas tratadas con control de IgG. Estos datos son consistentes con los efectos observados con otros fármacos de anticuerpos, lo que refleja la unión de la diana del fármaco en circulación. En el músculo de rata (recto femoral), el tratamiento con Ab2 conduce a un aumento de 1,9 veces (en comparación con las ratas tratadas con control de IgG) en la forma latente de miostatina. No se observa ningún cambio estadísticamente significativo en la proMiostatina. Estos datos indican que Ab2 se une a su diana, la miostatina pro/latente, y altera el procesamiento de la miostatina en el músculo y en la circulación. También se observó que el tratamiento con Ab2 aumenta la proMiostatina latente, pero no la en el músculo de rata (Figura 31B).

*Ejemplo 7: Aumento de la masa muscular y alteración de la expresión de la proteína miostatina en ratones tratados con Ab2 y comparación con un anticuerpo anti-miostatina comparador.*

## 45 Diseño del estudio

[0315] A ratones SCID macho de diez semanas de edad se les administró una sola dosis intraperitoneal (5 mg/kg) de cualquiera de Ab2, un anticuerpo de control IgG humano no funcional, o un anticuerpo comparador (AbMyo) que actúa mediante el bloqueo de la interacción de miostatina/receptor. Durante el transcurso del estudio, se recolectaron suero y músculo esquelético 1 hora, 4 horas, 48 horas, 7 días, 14 días, 21 días, 28 días y 56 días después de la dosificación. La recolección de suero se realizó mediante métodos estándar y las muestras se almacenaron a -80°C. Se recogieron los músculos esqueléticos (recto femoral, tibial anterior y sóleo), se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C. La masa magra se midió mediante resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNc) al inicio del estudio (antes de la dosificación del día 0) y semanalmente durante el transcurso del estudio.

## 55 Resultados

[0316] Efectos farmacodinámicos de tratamiento Ab2 fueron evaluados por la medición de la masa magra (por RMNc) durante el curso del estudio. La Figura 32 muestra las mediciones de masa magra durante el curso del estudio, donde los ratones tratados con Ab2 demuestran un claro aumento en la masa magra en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control IgG humano. Durante las primeras tres semanas del estudio, los ratones tratados con el anticuerpo comparador (AbMyo) muestran aumentos en la masa magra equivalentes a los del grupo Ab2. Sin embargo, a los 28 días después de la dosificación, los ratones tratados con AbMyo no mantienen una masa magra aumentada. Por el contrario, los ratones del grupo tratado con Ab2 mantienen su masa magra aumentada durante la duración del estudio (56 días). Estos datos sugieren que Ab2 tiene una duración de acción más prolongada que AbMyo.

**[0317]** La exposición al fármaco se midió en muestras de suero usando un ELISA específico para IgG humana con cantidades conocidas de cada medicamento que se usa como patrón de referencia. Como se muestra en la Figura 33, tan pronto como 1 hora después de la inyección, tanto el Ab2 como el anticuerpo comparador (AbMyo) se detectan en suero y se pueden detectar niveles >1 mg/ml de ambos anticuerpos durante todo el estudio. Sin embargo, Ab2 exhibe una vida media significativamente más larga y un área inferida bajo la curva (AUCINF) que AbMyo, lo que sugiere que, a dosis similares, Ab2 exhibe una exposición significativamente mayor que AbMyo.

**[0318]** Los niveles relativos de miostatina pro y latente se determinó por transferencia Western cuantitativa de lisado muscular o muestras de suero. Se generaron lisados musculares a partir de muestras musculares congeladas instantáneamente mediante pulverización, seguido de lisis en tampón T-PER complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después de la lisis, las muestras que contenían concentraciones iguales de proteína se separaron mediante geles PAGE y se transfirieron por transferencia Western a una membrana de PVDF de baja fluorescencia. Para los lisados de músculo, se cargaron 10-50 ng de proteína total en el gel. El plasma se diluyó 1:10 en PBS y se cargaron 10 µl de cada muestra en el gel. Como patrones de tamaño, también se cargaron en el gel 0,1-1 ng pro recombinante y/o miostatina latente. La identificación de la proteína miostatina se logró utilizando un anticuerpo que reconoce el predominio de la miostatina latente (AF1539, R&D Systems), seguido de la detección con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Para todos los análisis de transferencia Western, se analizaron un mínimo de tres muestras por grupo.

**[0319]** Miostatina en suero se midió en ratones tratados con fármaco y en los controles utilizando el transferencia Western fluorescente. A pesar de la exposición sérica aumentada de Ab2, los niveles de miostatina latente en suero en ratones tratados con Ab2 y AbMyo fueron similares (Figura 34). Estos datos sugieren que los niveles circulantes de fármaco libre (no unido a la diana) son suficientemente mayores que el nivel de la diana, de modo que el aumento de la exposición sérica de Ab2 no se traduce en mayores aumentos de miostatina latente circulante que los observados con AbMyo.

**[0320]** Los niveles de miostatina en el músculo (rectus femoris) también se evaluaron por transferencia de Western fluorescente. Se midieron los niveles relativos de proMiostatina latente en lisados de músculo de ratón mediante transferencia de Western fluorescente. La miostatina latente está elevada en los músculos tratados con Ab2 y AbMyo (Fig. 35A). Sin embargo, la elevación de la miostatina latente en los músculos tratados con AbMyo vuelve a la línea de base el día 28, mientras que los de los músculos tratados con Ab2 permanecen elevados hasta al menos este momento ( $P < 0,003$  frente al tratamiento con AbMyo). Se observa una tendencia similar con proMiostatina (Fig. 35B), aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ( $P = 0,068$ ). Estos datos sugieren una mayor duración de acción de Ab2 en el sitio de acción del fármaco, el músculo esquelético.

#### *Ejemplo 8: Ab2 aumenta la generación de fuerza muscular.*

**[0321]** En este Ejemplo, se evaluaron los efectos de Ab2 en la generación de fuerza muscular. Brevemente, se administró IgG (20 mg/kg) intraperitonealmente a ratones macho C57BL/6J, teniendo Ab2 una región constante del isotipo IgG1 de ratón (20 mg/kg), o PBS una vez por semana durante 4 semanas ( $n = 10$  por grupo).

**[0322]** A la terminación del estudio, los músculos se diseccionaron y se pesaron, y rendimiento muscular *in vitro* del músculo extensor digitorum longus (EDL) se midió *in vitro* con un sistema de palanca músculo 305C (Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN) adaptado con un baño de perfusión horizontal. El músculo se colocó en una solución tamponada fisiológica helada y se ató una sutura de seda al tendón proximal. El músculo se colocó en el baño horizontal del sistema de palanca muscular 305C y se perfundió con tampón fisiológico oxigenado con 95% de  $O_2$ /5% de  $CO_2$  y se mantuvo a 37°C.

**[0323]** Las suturas se ataron a un poste fijo en un lado, y el brazo de palanca en el otro. Se administraron una serie de estimulaciones de campo de 1 Hz y 100 Hz (pulso de 0,2 ms, duración de 100 ms) a una frecuencia de 0,01 Hz a través de electrodos de platino que flanqueaban el músculo para garantizar que las suturas estén apretadas y que la fuerza máxima desarrollada sea estable. Una vez estable, se midió la estimulación muscular directa: fuerza frente a frecuencia. Los electrodos de alambre de platino se colocan proximales y distales al abdomen del músculo.

**[0324]** Tensión de contracción se controló con un pulso de 1 ms y el voltaje aumenta hasta que se alcanza la fuerza máxima. A continuación, se realizó una serie de estimulaciones con una frecuencia de estimulación creciente (pulso de 1 ms, duración del tren de 250 ms): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Hz, seguido de una estimulación final a 1 Hz.

**[0325]** Tal como se representa en la Figura 36A, después de 4 semanas de tratamiento con Ab2, se incrementó la masa muscular y la función. El peso medio de EDL aumentó en un 33% y el peso medio de los gastrocnemios y cuádriceps aumentó en un 19%.

**[0326]** Tal como se representa en la Figura 36B, la generación de fuerza máxima aumentó en un 30% después de 4 dosis semanales de Ab2.

**[0327]** Aunque se han descrito e ilustrado aquí varias realizaciones de la presente descripción, personas de experiencia ordinaria en la técnica fácilmente imaginarán una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/o la obtención de los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y se considera que

cada una de dichas variaciones y/o modificaciones está dentro del alcance de la presente divulgación. De manera más general, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en este documento deben ser ejemplares y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para lo cual se utilizan las enseñanzas de la presente divulgación. Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinarse usando únicamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la divulgación descrita en el presente documento. Por lo tanto, debe entenderse que las realizaciones anteriores se presentan a modo de ejemplo únicamente y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes a las mismas, la divulgación se puede practicar de otra manera que la descrita y reivindicada específicamente. La presente divulgación está dirigida a cada característica, sistema, artículo, material y/o método individual descrito en el presente documento. Además, cualquier combinación de dos o más de tales características, sistemas, artículos, materiales y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales y/o métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluye dentro del alcance de la presente divulgación.

**[0328]** Los artículos indefinidos "un" y "una" como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, deben entenderse en el sentido de "al menos uno".

**[0329]** La frase "y/o", como se usa aquí en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que significa "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes de forma conjunta en algunos casos y disyuntivamente presente en otros casos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos distintos de los elementos identificados específicamente por la cláusula "y/o", ya sean relacionados o no con los elementos identificados específicamente, a menos que se indique claramente lo contrario. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto como "comprende" puede referirse, en una realización, a A sin B (opcionalmente incluyendo elementos de otros que B); en otra realización, a B sin A (opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra realización más, tanto para A como para B (que incluyen opcionalmente otros elementos); etc.

**[0330]** Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse por tener el mismo significado que "y/o" como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan elementos en una lista, "o" o "y/o" se interpretará como inclusivo, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluye más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no listados. Solo los términos que indiquen claramente lo contrario, como "solo uno de" o "exactamente uno de" o, cuando se utilicen en las reivindicaciones, "consistente en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" como se usa en este documento solo se interpretará como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno u otro, pero no ambos") cuando esté precedido por términos de exclusividad, como "cualquiera", "uno de," "sólo uno de" o "exactamente uno de". "Consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario como se usa en el campo de la ley de patentes.

**[0331]** Como se usa aquí en la especificación y en las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de uno o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluyendo al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos pueden estar presentes opcionalmente distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "al menos uno", ya sean relacionados o no con aquellos elementos específicamente identificados. Por tanto, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de forma equivalente, "al menos uno de A o B", o, de forma equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos una, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que opcionalmente incluye otros elementos); etc.

**[0332]** En las reivindicaciones, así como en la especificación anterior, todas las frases de transición como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que involucra", "que sostiene", y similares deben entenderse como abiertos, es decir, que significan que incluyen pero sin limitarse. Solo las frases transitorias "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" serán frases transitorias cerradas o semicerradas, respectivamente, como se establece en el Manual de Procedimientos de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, Sección 2111.03.

**[0333]** El uso de términos ordinales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de reivindicación sobre otro, o el orden temporal en donde se realizan los actos de un método, pero se utilizan simplemente como etiquetas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un nombre determinado de otro elemento que tiene el mismo nombre (pero para el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación.

## LISTA DE SECUENCIAS

**[0334]**

5	<110> Scholar Rock, Inc.
	<120> ANTICUERPOS DE MISOSTATINA ANTI-PRO/LATENTE Y SU USO
	<130> S1918,70001WO00
10	<140> Aún no asignado
	<141> Al mismo tiempo que la presente
	<150> US 62/219,094
15	<151> 2015-09-15
	<160> 65
	<170> Patente en versión 3,5
20	<210> 1
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
25	<220>
	<223> Polipéptido sintético
	<400> 1
30	
	<b>Ser Ser Tyr Gly Met His</b>
	<b>1 5</b>
35	
	<210> 2
	<211> 10
	<212> PRT
40	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Polipéptido sintético
45	<400> 2
	<b>Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His</b>
50	<b>1 5 10</b>
	<210> 3
	<211> 10
55	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Polipéptido sintético
60	<400> 3
	<b>Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met His</b>
65	<b>1 5 10</b>



5 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <400> 4  
  
 15 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 20 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <400> 5  
  
 30 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn  
 1 5  
  
 35 <210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <400> 6  
  
 45 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 50 Gly  
  
 <210> 7  
 <211> 7  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 60 <400> 7  
  
 65 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile  
 1 5

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 8  
 10  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 15  
 Gly  
 <210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
 <400> 9  
 30  
 Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn  
 1 5  
 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40  
 <400> 10  
 45  
 Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15  
 Val  
 50  
 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55  
 <400> 11  
 60  
 Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15  
 65  
 Val

5 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <400> 12  
  
 15           Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His  
             1                           5                           10  
  
 20 <210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Secuencia  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 25 <400> 13  
  
 30                   Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr  
                     1                           5  
  
 35 <210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40 <400> 14  
  
 45           Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His  
             1                           5                           10  
  
 50 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 55 <400> 15  
  
 60                   Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr  
                     1                           5  
  
 65 <210> 16

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 16  
 10  
     Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val His  
     1                    5                    10  
 15  
 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 17  
 25  
             Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr  
             1                    5  
 30  
 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 18  
 40  
             Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser  
             1                    5  
 45  
 <210> 19  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 19  
 55  
                     Ser Asp Asn  
                     1  
 60  
 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 65

	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
5	<400> 20	
	Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser	
10		
	1	5
15	<210> 21	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 21	
25		
	Ser Asp Asp	
	1	
30	<210> 22	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 22	
40		
	Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val	
	1	5 10
45	<210> 23	
	<211> 10	
	<212> PRT	
50	<213> Artificial Secuencia	
	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
55	<400> 23	
	Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu Asn Gly Val	
60	1	5 10
65	<210> 24	
	<211> 126	
	<212> PRT	

# ES 2 881 642 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 24

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly  
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 25

# ES 2 881 642 T3

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

<210> 26  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <400> 26

# ES 2 881 642 T3

5

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly  
100 105 110

40

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

45

<210> 27  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Polipéptido sintético  
  
<400> 27

50

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

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



# ES 2 881 642 T3

	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35						40					45			
5	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50						55					60				
10	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
15	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
20	Ala	Arg	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Phe	Leu	Glu	Trp	Ser	His	Lys	Tyr	Gly
				100					105					110		
25	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115					120					125			
30	<210> 28															
	<211> 126															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> Polipéptido sintético															
35	<400> 28															

# ES 2 881 642 T3

	Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
5	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
10	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
15	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
20	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
25	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
30	Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly	
	100 105 110	
35	Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120 125	
40	<210> 29	
	<211> 126	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 29	

# ES 2 881 642 T3

5

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

10

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

15

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

20

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

25

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

30

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

35

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly  
100 105 110

40

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

45

<400> 30

50

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

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

# ES 2 881 642 T3

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

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

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

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 31

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

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

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 32

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

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 33

# ES 2 881 642 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Thr	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Ser	Asp	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50						55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Ser	Leu	
					85					90					95		
30	Asn	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu				
				100					105								
35	<210> 34																
	<211> 109																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
40	<220>																
	<223> Polipéptido sintético																
	<400> 34																

# ES 2 881 642 T3

5

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

10

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

15

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

20

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

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

25

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu  
85 90 95

30

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

35

<210> 35  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Polipéptido sintético  
<400> 35

# ES 2 881 642 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5																	
	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Asn	
				20					25					30			
10																	
	Thr	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15																	
	Ile	Tyr	Ser	Asp	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		50					55					60					
20																	
	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	
	65					70					75					80	
25																	
	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Ser	Leu	
					85					90					95		
30																	
	Asn	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu				
				100					105								
35																	
	<210>	36															
	<211>	98															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
40																	
	<220>																
	<223>	Polipéptido sintético															
	<400>	36															



# ES 2 881 642 T3

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 10 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 15 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg  
 30 <210> 37  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40 <400> 37

# ES 2 881 642 T3

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

Asn Gly

30 <210> 38  
 <211> 378  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 38

40	cagatccagc	tggtgcagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
	tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactctggg	ccgccaggct	120
45	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtaa	taaatactat	180
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
	ctgcaaata	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc	300
50	ctggtgcat	ttttggagtg	gtcgactac	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc	360
	acggtcaccg	tctcctca					378

55 <210> 39  
 <211> 378  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 39

# ES 2 881 642 T3

5  
10  
15

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactctggg	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc	300
ctggtgcat	ttttggagtg	gtcgactac	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc	360
acggtcaccg	tctcctca					378

20  
25

<210> 40  
<211> 378  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

30  
35  
40

cagatccagc	tggtgcagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	cgccttcagt	agctatggca	tgactctggg	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtat	caaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc	300
ctggtgcat	ttttggagtg	gtcgacaag	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc	360
acggtcaccg	tctcctca					378

45  
50

<210> 41  
<211> 378  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

55  
60  
65

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	cgccttcagt	agctatggca	tgactctggg	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtat	caaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc	300
ctggtgcat	ttttggagtg	gtcgacaag	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc	360
acggtcaccg	tctcctca					378

# ES 2 881 642 T3

5	<210> 42 <211> 378 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Polinucleótido sintético		
10	<400> 42		
	cagatccagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
15	tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120	
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat	180	
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
20	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc	300	
	ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360	
25	acggtcaccg tctcctca	378	
30	<210> 43 <211> 378 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Polinucleótido sintético		
35	<400> 43		
	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
40	tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120	
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat	180	
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
45	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc	300	
	ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360	
50	acggtcaccg tctcctca	378	
55	<210> 44 <211> 327 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Polinucleótido sintético		
60	<400> 44		

# ES 2 881 642 T3

	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
5	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgcccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggcatcag tgggctccag	240
10	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggggtgttc	300
	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
15		
	<210> 45	
	<211> 327	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 45	
	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
30	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgcccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
35	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggggtgttc	300
	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
40	<210> 46	
	<211> 327	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 46	
50		
	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
55	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggcatcag tgggctccag	240
	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
60	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
65	<210> 47	
	<211> 327	

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 47

10	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct	180
15	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
20	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327

<210> 48  
 <211> 327  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

30	<400> 48	
	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc	120
35	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggcctcag tgggctccag	240
40	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327

<210> 49  
 <211> 327  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 49

55	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct	180
60	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
65	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327

	<210> 50
	<211> 452
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Polipéptido sintético
10	<400> 50

# ES 2 881 642 T3

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



Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
245 250 255

5

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
260 265 270

10

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

15

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
290 295 300

20

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

25

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
325 330 335

30

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
340 345 350

35

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

40

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

45

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

50

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
405 410 415

55

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

60

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Leu Gly  
450

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 215

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

# ES 2 881 642 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <400> 51

10	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	1 5 10 15
15	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	20 25 30
20	Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	35 40 45
25	Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	50 55 60
30	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	65 70 75 80
35	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	85 90 95
40	Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	100 105 110
45	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu	115 120 125
50	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro	130 135 140
55	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala	145 150 155 160
60	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala	165 170 175
65	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg	180 185 190
	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr	195 200 205
	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	210 215

5

<210> 52  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 52

ES 2 881 642 T3

	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	
	1				5					10					15		
5	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	
				20					25					30			
10	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	
			35					40					45				
15	Ile	Ser	Lys	Asp	Val	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	
		50					55					60					
20	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	
	65					70					75					80	
25	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	
					85					90					95		
30	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Val	Asp	Gly	Lys	Pro	
				100					105					110			
35	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	
			115					120					125				
40	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	
		130					135					140					
45	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
50	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	
					165					170					175		
55	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	
				180					185					190			
60	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	
			195					200					205				
65	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	
	225					230					235					240	

# ES 2 881 642 T3

	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser
					245					250					255	
5	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp
				260					265					270		
10	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly
			275					280					285			
15	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val
		290					295					300				
20	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr
	305					310					315					320
25	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile
					325					330					335	
30	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser
				340					345					350		

<210> 53  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 53

# ES 2 881 642 T3

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

ES 2 881 642 T3

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

5

<210> 54  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 54



ES 2 881 642 T3

	Asn	Glu	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Glu	Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys
	1				5					10					15	
5	Asn	Ala	Cys	Ala	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala
				20					25					30		
10	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn
			35					40					45			
15	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu
		50					55					60				
20	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp
	65					70					75					80
25	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile
					85					90					95	
30	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro
				100					105					110		
35	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val
			115					120					125			
40	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr
		130					135					140				
45	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly
	145					150					155					160
50	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Gly
				165						170					175	
55	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp
				180					185					190		
60	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp
			195					200					205			
	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp
		210					215					220				
	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg

	225		230		235		240									
5	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser
				245					250						255	
10	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp
				260					265					270		
15	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly
			275					280					285			
20	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val
		290					295					300				
25	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr
	305					310					315					320
30	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile
					325					330					335	
35	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser
				340					345					350		
40	<210> 55 <211> 277 <212> PRT <213> Macaca fascicularis  <400> 55															

# ES 2 881 642 T3

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

	100	105	110
5	Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val 115 120 125		
10	Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr 130 135 140		
15	Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly 145 150 155 160		
20	Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly 165 170 175		
25	Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp 180 185 190		
30	Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp 195 200 205		
35	Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp 210 215 220		
40	Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg 225 230 235 240		
45	Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser 245 250 255		
50	Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp 260 265 270		
55	Asp Trp Ile Ile Ala 275		
60	<210> 56 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial  <220> <223> Polipéptido sintético  <400> 56		
65	Arg Ser Arg Arg 1		

# ES 2 881 642 T3

5	<p>&lt;210&gt; 57          &lt;211&gt; 4          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Polipéptido sintético</p>	
10	<400> 57	
15		Arg Val Arg Arg 1
20	<p>&lt;210&gt; 58          &lt;211&gt; 5          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Polipéptido sintético</p>	
25	<400> 58	
30		Cys Pro Pro Cys Pro 1 5
35	<p>&lt;210&gt; 59          &lt;211&gt; 17          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Polipéptido sintético</p>	
40	<400> 59	
45		His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val 1 5 10 15
50	Ser	
55	<p>&lt;210&gt; 60          &lt;211&gt; 89          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Polipéptido sintético</p>	
60	<400> 60	
65		

# ES 2 881 642 T3

5	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 1 5 10 15
10	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn 20 25 30
15	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 35 40 45
20	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60
25	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln 65 70 75 80
30	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 85
35	<210> 61 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Polipéptido sintético  <400> 61
45	Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 1 5 10
50	<210> 62 <211> 33 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Polipéptido sintético  <400> 62
60	Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln 1 5 10 15
65	Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala 20 25 30
	Thr

# ES 2 881 642 T3

<210> 63  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 63

```

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
1          5          10          15
Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
          20          25          30
Arg Cys
  
```

<210> 64  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Polinucleótido sintético

<400> 64

```

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

<210> 65  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <213> Polinucleótido sintético

<400> 65

# ES 2 881 642 T3

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



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

5	Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys	340	345	350	
10	Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His	355	360	365	
15	Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr	370	375	380	
20	Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln	385	390	395	400
25	Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly	405	410	415	
	Cys Ser				

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, en donde el anticuerpo se une específicamente a miostatina pro/latente.
- 10 2. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.
- 15 3. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
4. El anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende un dominio constante IgG4.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG4 que tiene una sustitución de la cadena principal de Ser a Pro que produce una bisagra similar a IgG1 y permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas.
- 20 6. El anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por la proteasa toloide.
- 25 7. El anticuerpo aislado según la reivindicación 6, en donde el anticuerpo inhibe la formación proteolítica de miostatina madura por la proteasa toloide con una  $CI_{50}$  inferior a 1 mM, y/o presenta una reacción cruzada con miostatina pro/latente humana y murina.
- 30 8. Un método in vitro para reducir la activación del receptor de miostatina en células presentes en un medio que comprende miostatina pro/latente, comprendiendo el método administrar al medio un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en una cantidad eficaz para inhibir la activación proteolítica de la miostatina pro/latente.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una miopatía, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la composición es: (i) una composición liofilizada, (ii) una composición líquida o (iii) congelada.
- 40 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 (iii), en la que la composición se congela a una temperatura menor o igual a -65°C.
13. Una jeringa que comprende la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12.
- 45 14. Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 45.
- 50 15. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 14.

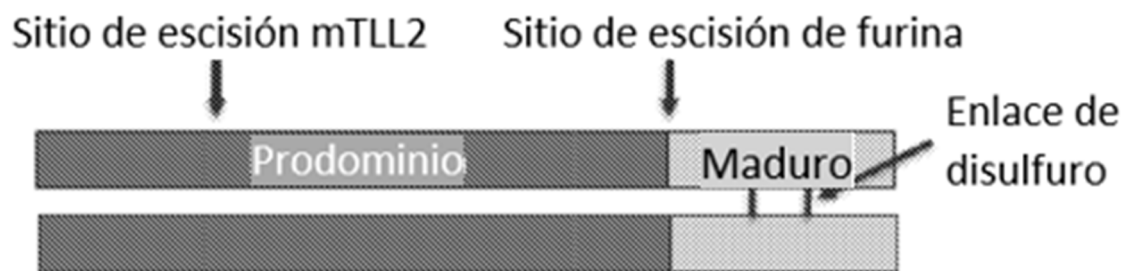


FIG. 1A

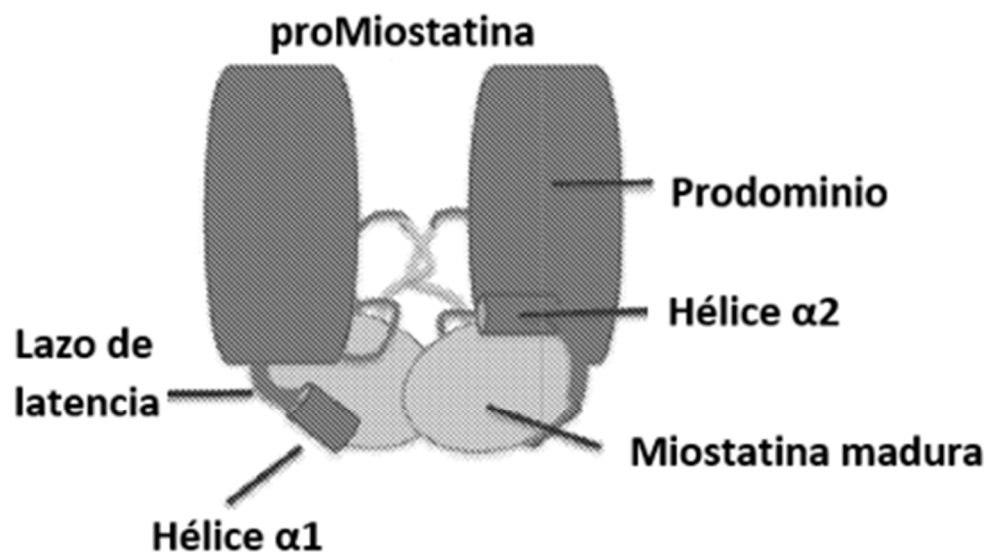


FIG. 1B

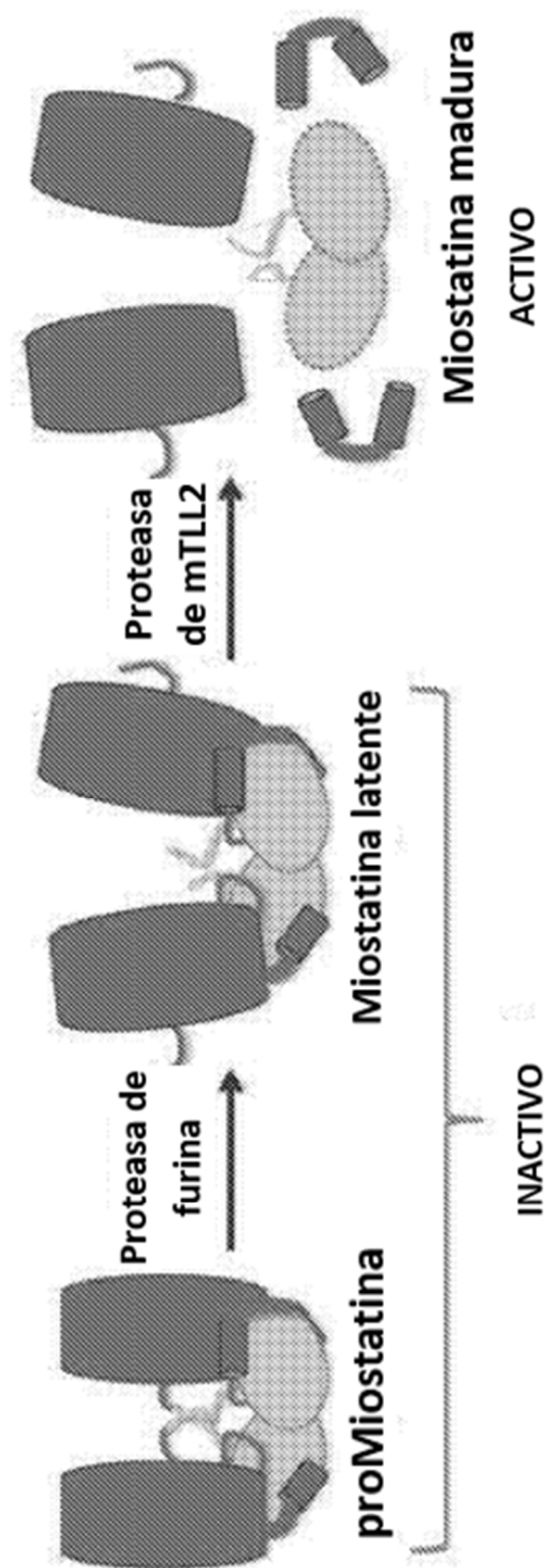


FIG. 2

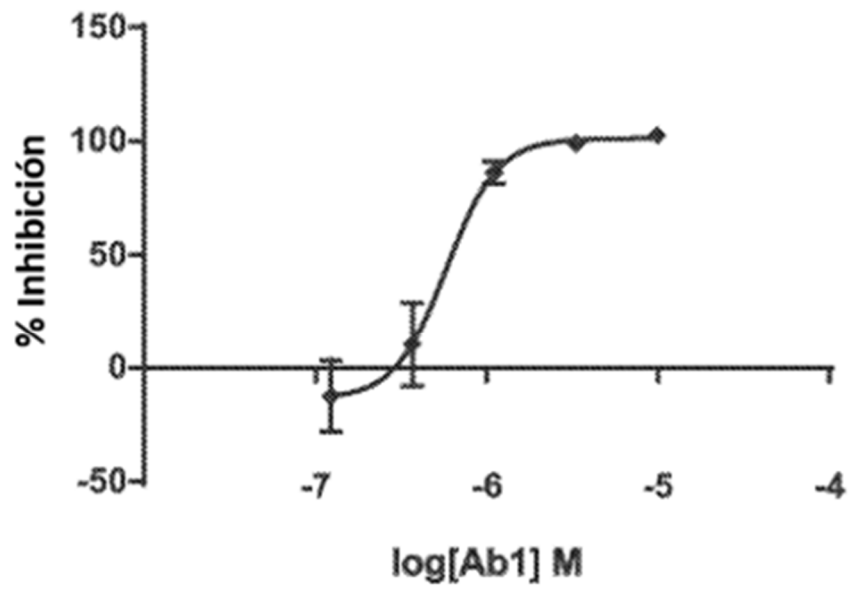


FIG. 3A

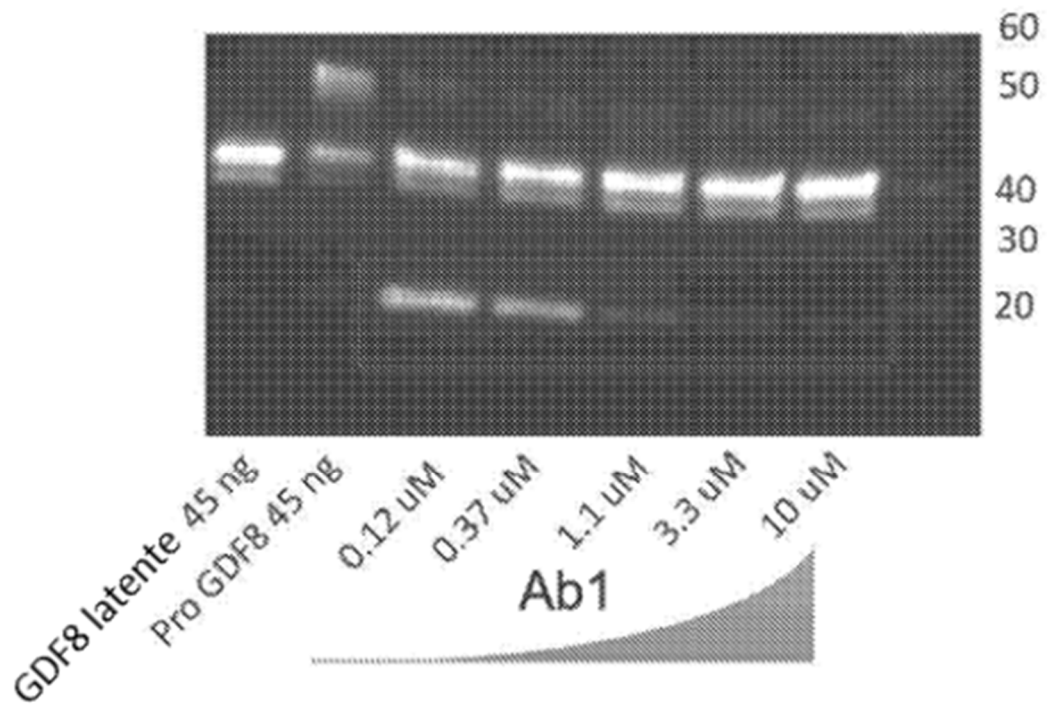


FIG. 3B

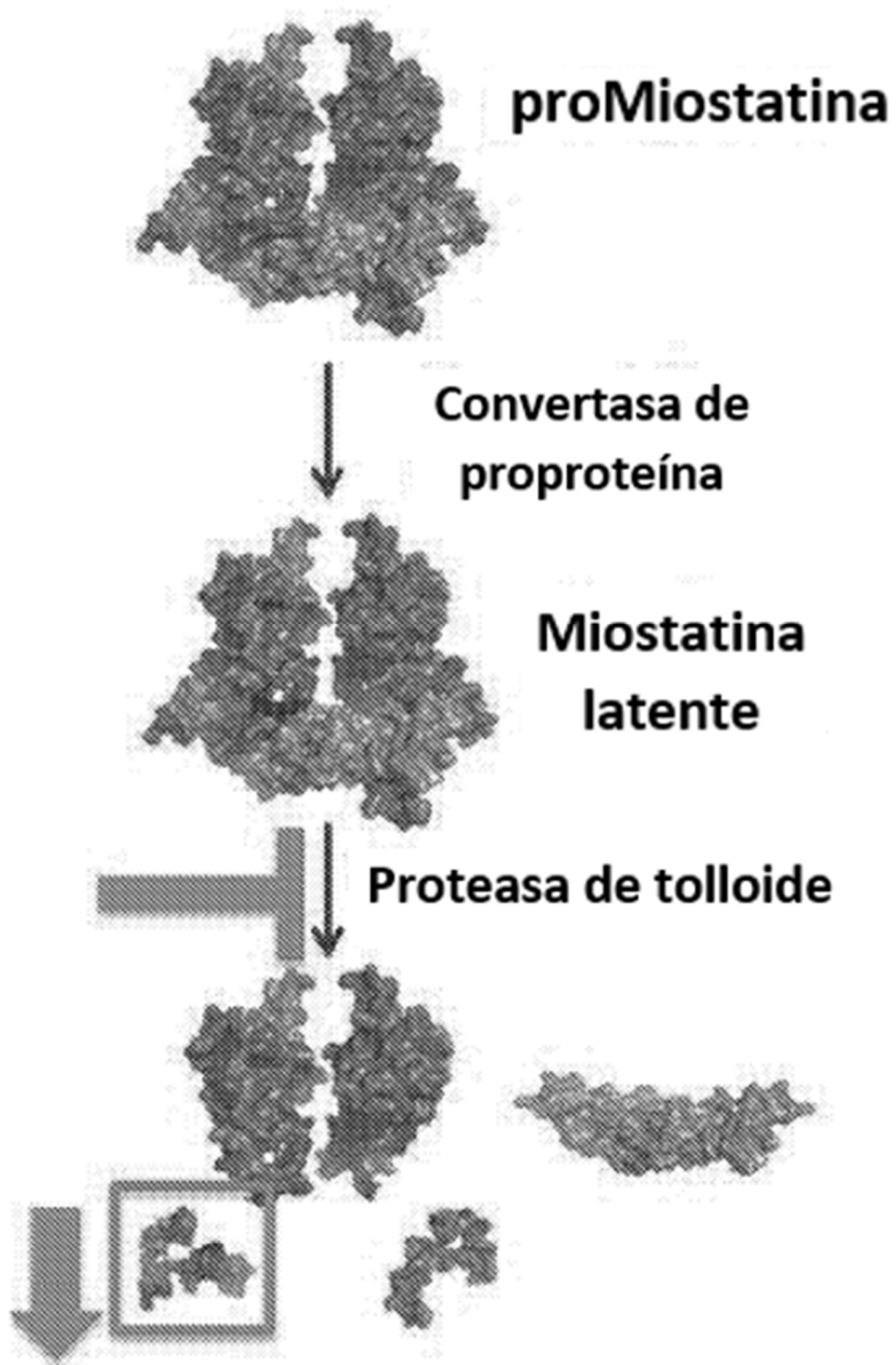


FIG. 3C

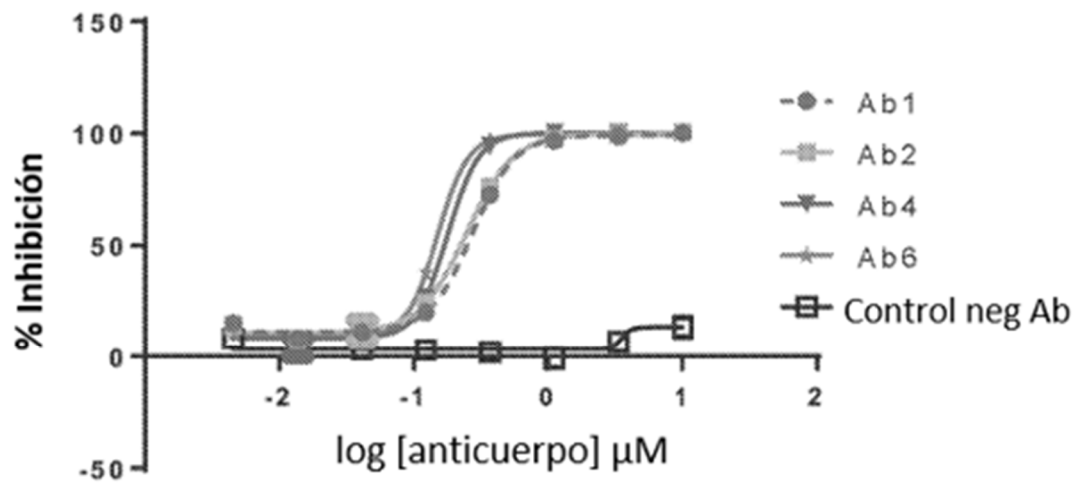


FIG. 4

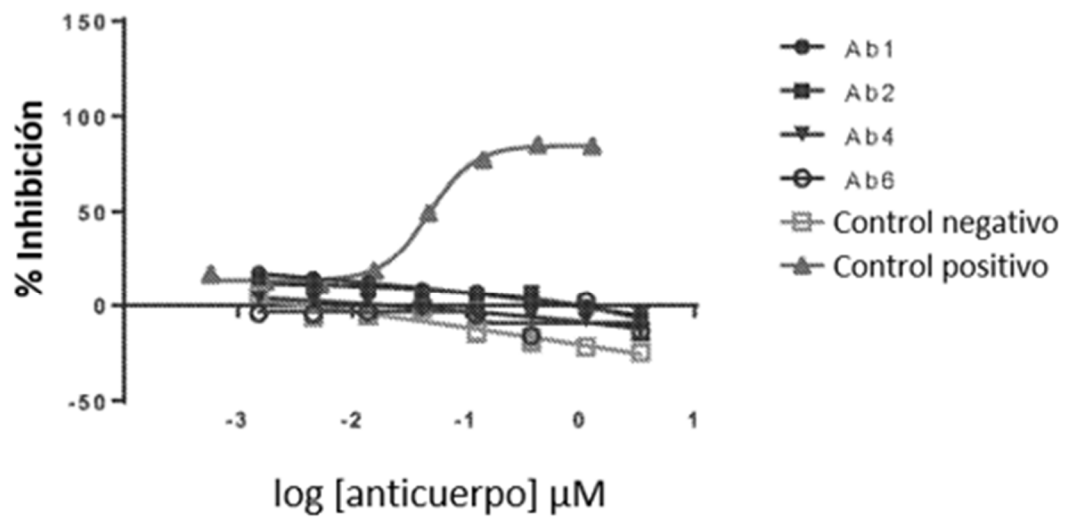


FIG. 5



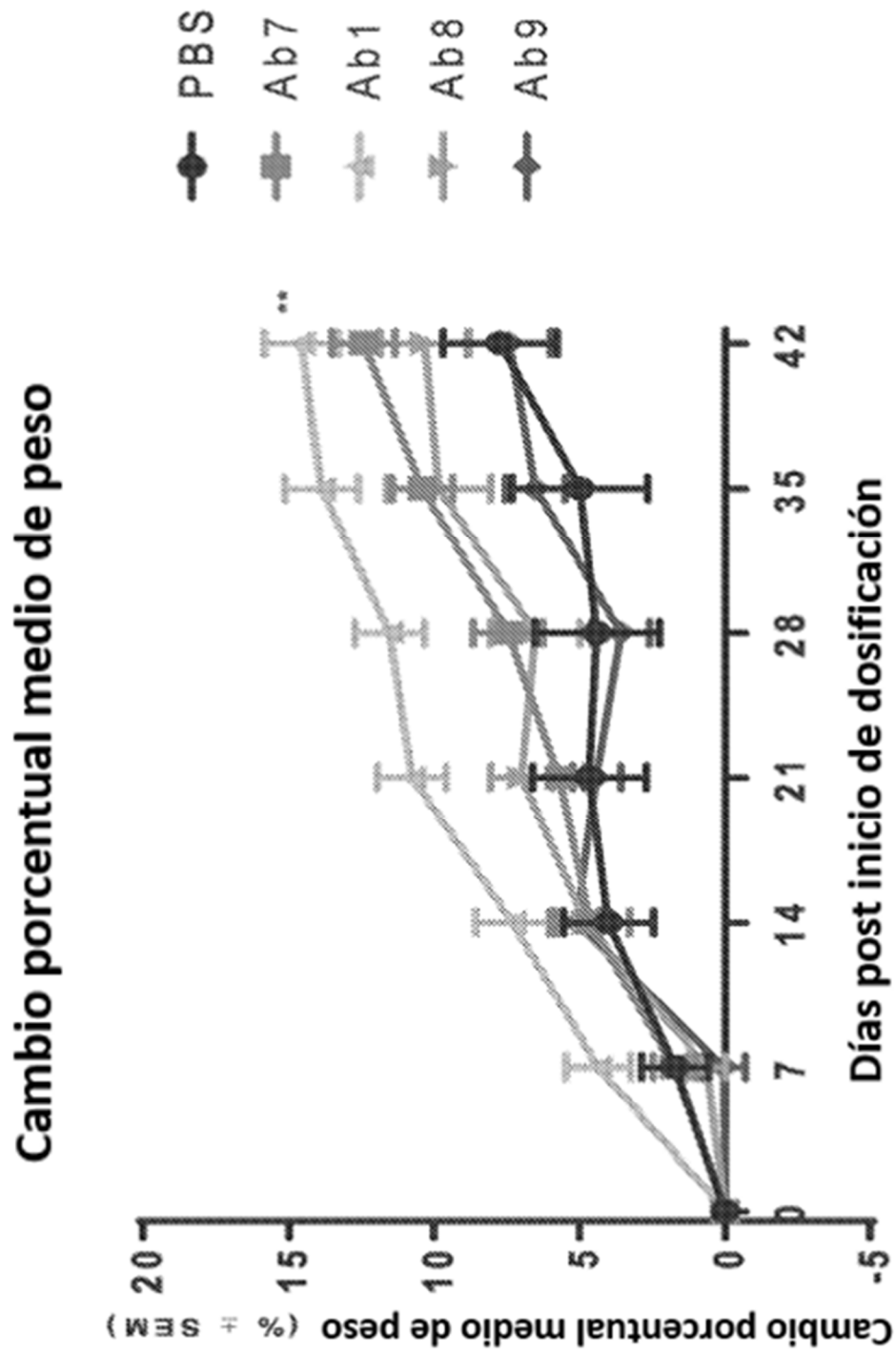
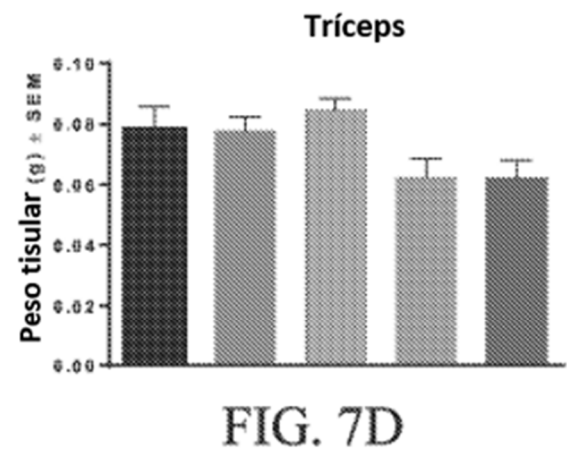
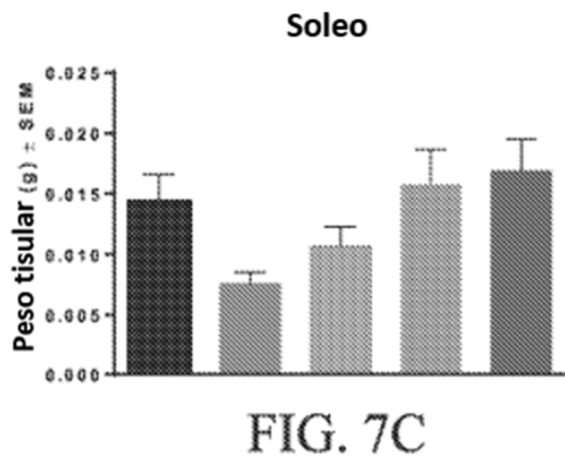
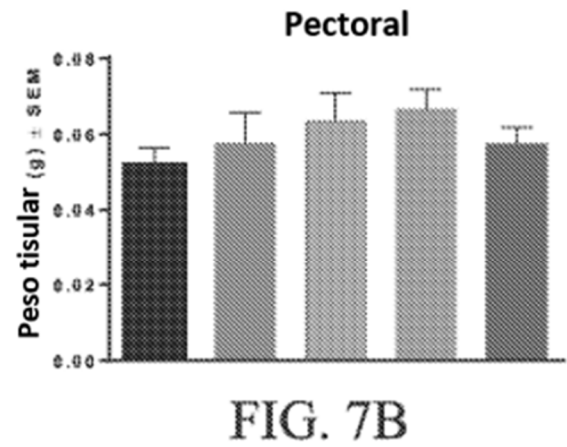
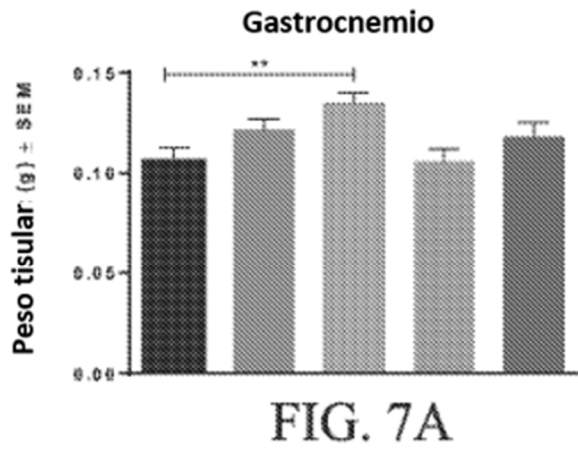


FIG. 6



- Grupo 1: Control de vehículo
- ▨ Grupo 2: Ab7 (25mg/kg)
- ▩ Grupo 3: Ab1 (25mg/kg)
- ▧ Grupo 4: Ab8 (25mg/kg)
- ▦ Grupo 5: Ab9 (25mg/kg)

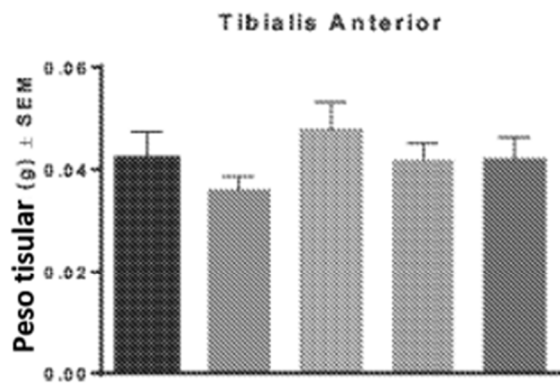


FIG. 8A

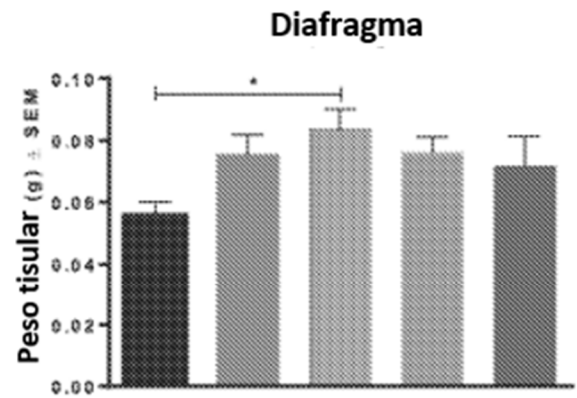


FIG. 8B

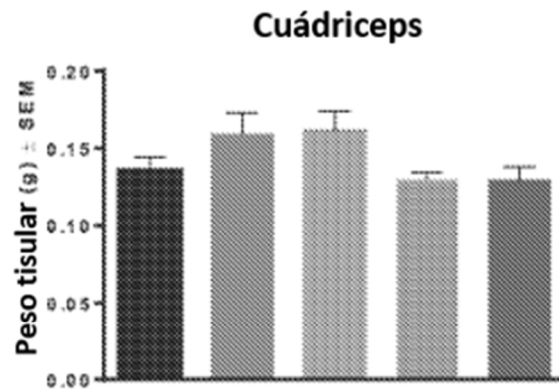


FIG. 8C

- Grupo 1: Control de vehículo
- ▒ Grupo 2: Ab7 (25mg/kg)
- ▓ Grupo 3: Ab1 (25mg/kg)
- ▒ Grupo 4: Ab8 (25mg/kg)
- ▓ Grupo 5: Ab9 (25mg/kg)

### Cambio porcentual medio de peso

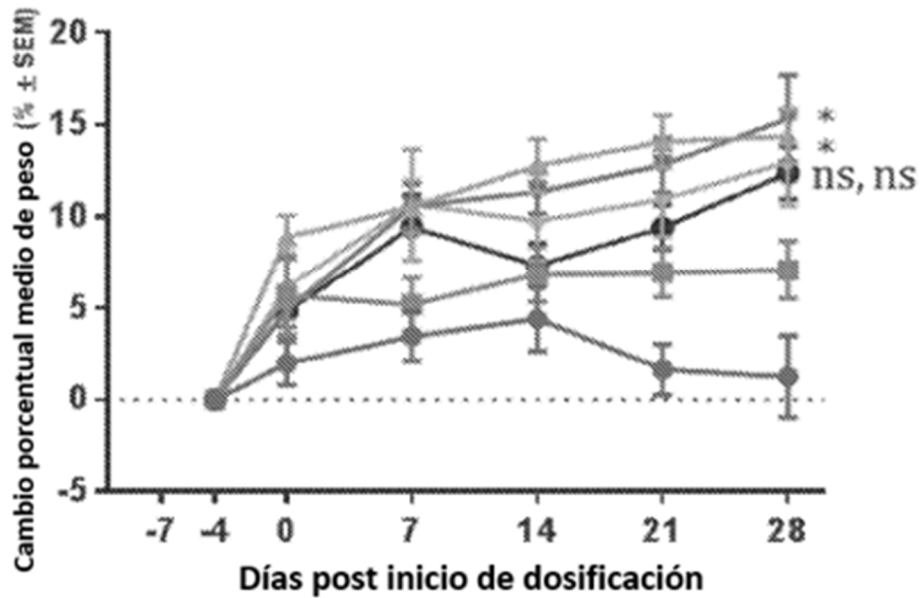


FIG. 9A

- PBS
- IgG ctrl (60 mg/kg/sem)
- ▲ Ab1 (60 mg/kg/sem)
- ✱ Ab1 (20 mg/kg/sem)
- ◆ Ab1 (6 mg/kg/sem)
- Ab1 (2 mg/kg/sem)

### Cambio porcentual medio de masa magra

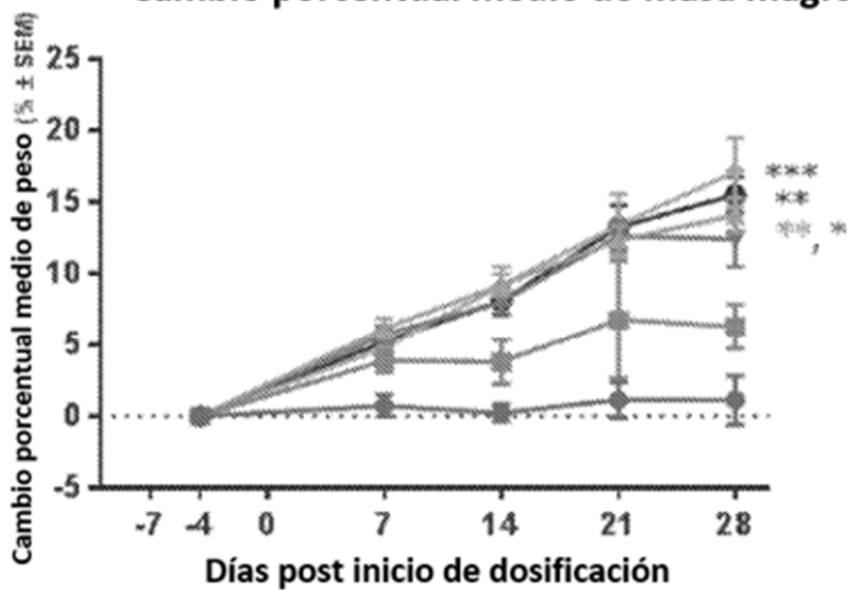


FIG. 9B

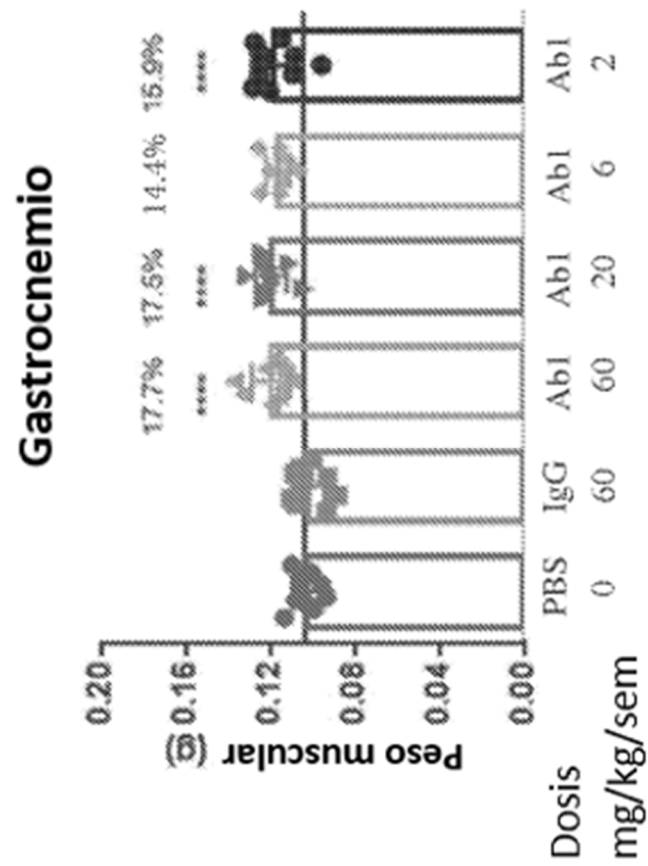


FIG. 10B

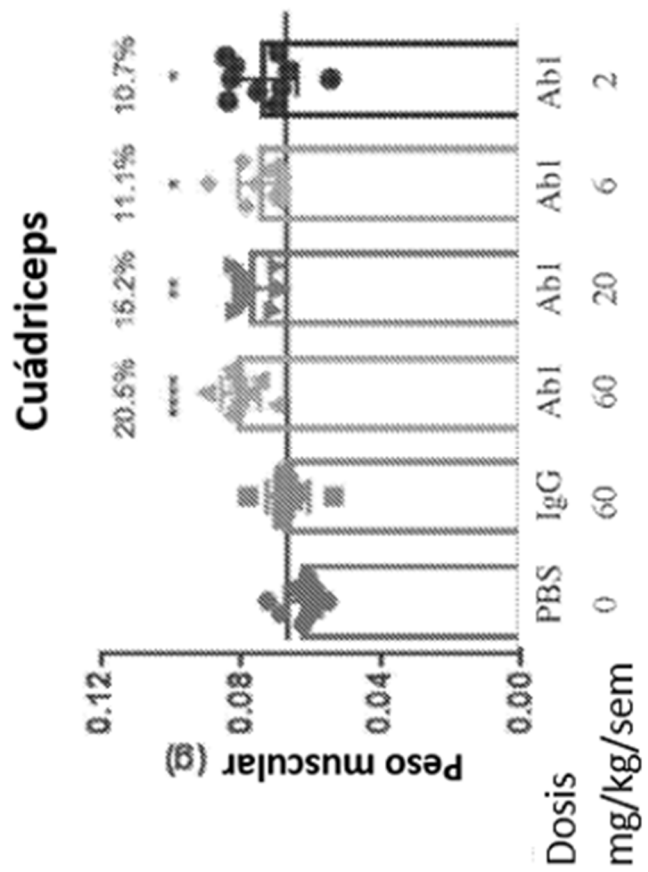


FIG. 10A

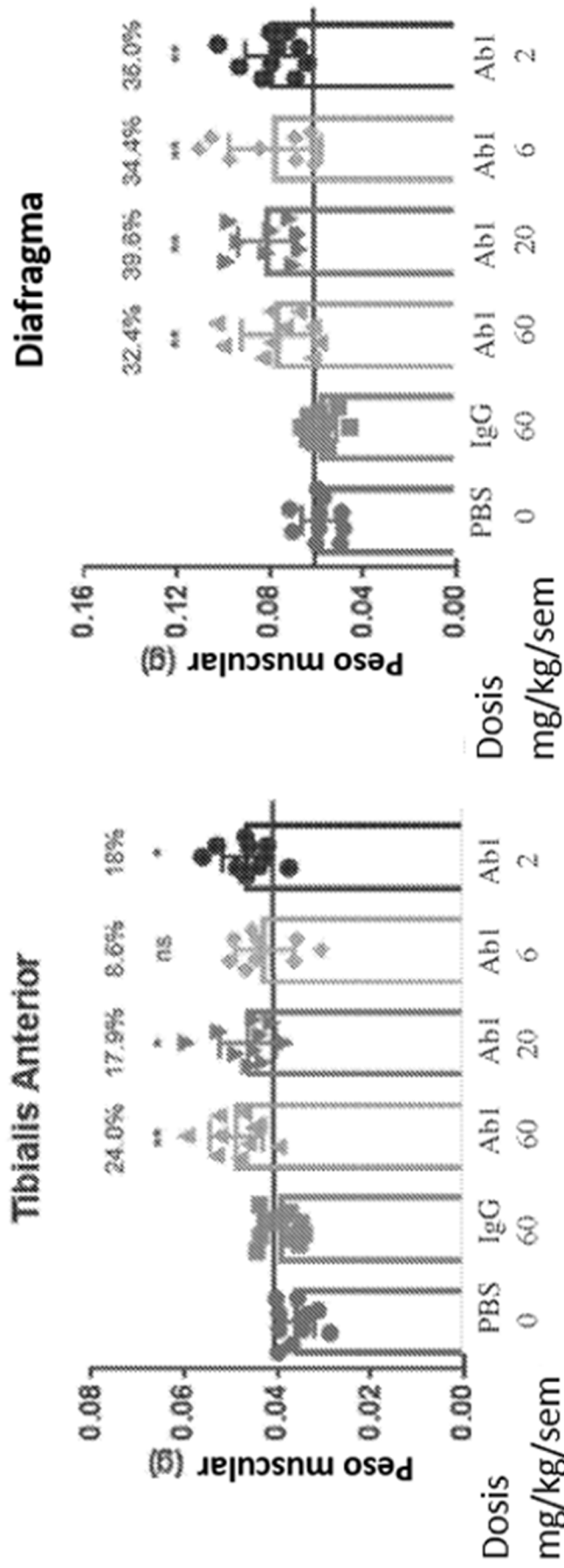


FIG. 10D

FIG. 10C

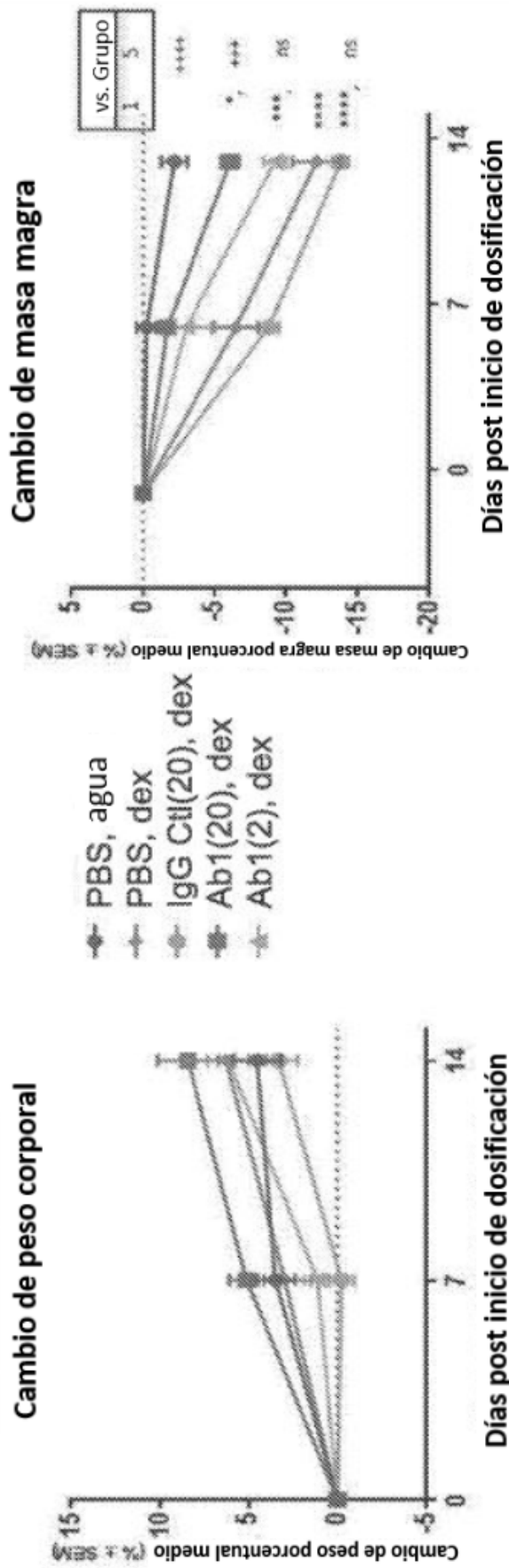


FIG. 11A

FIG. 11B

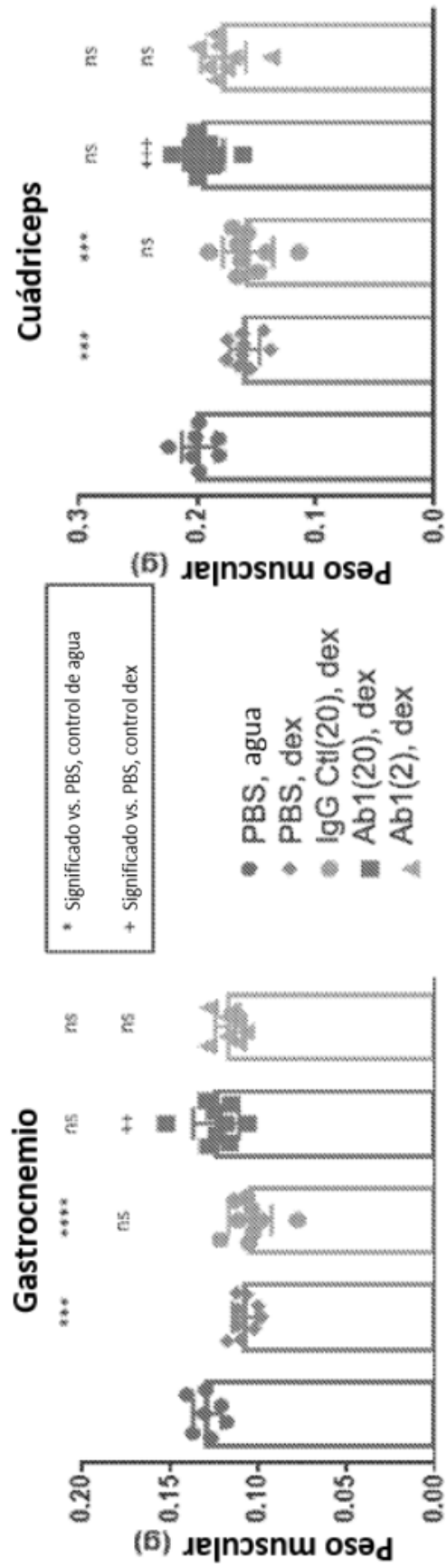


FIG. 12A

FIG. 12B



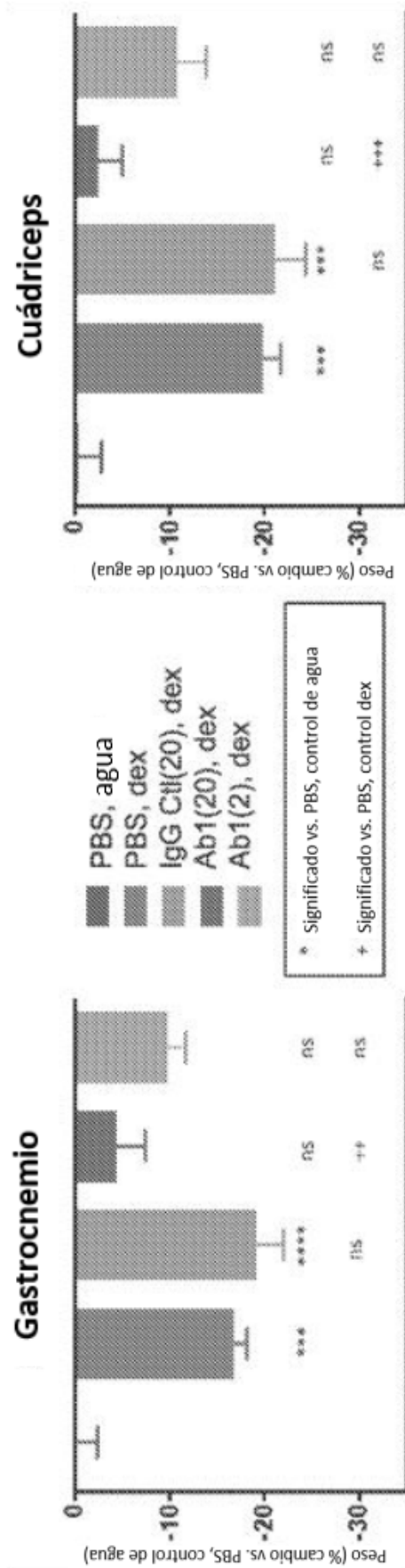


FIG. 12C

FIG. 12D

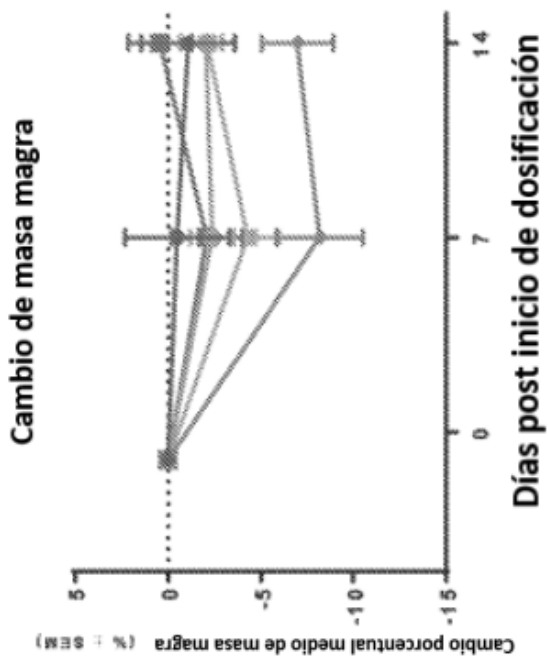


FIG. 13B

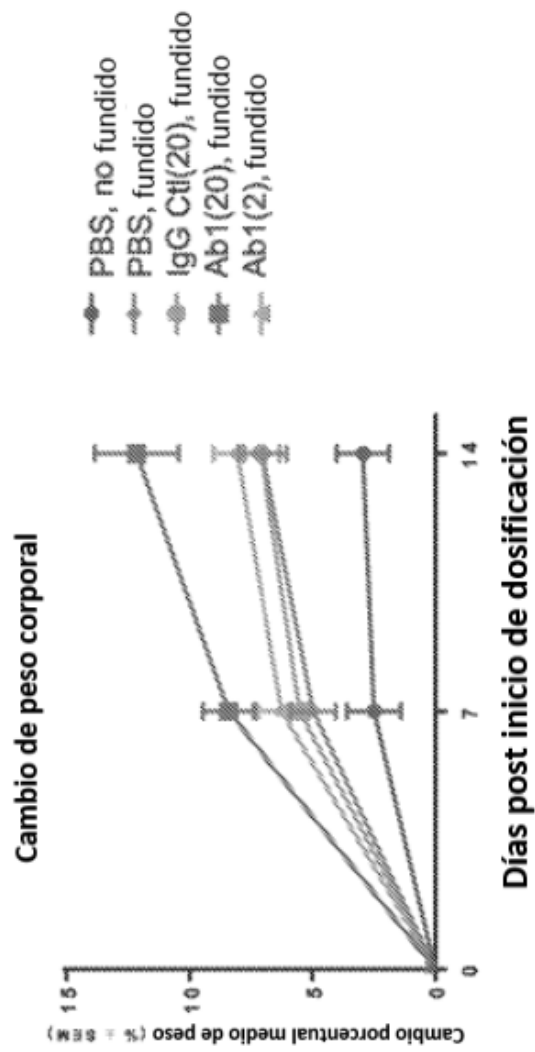


FIG. 13A

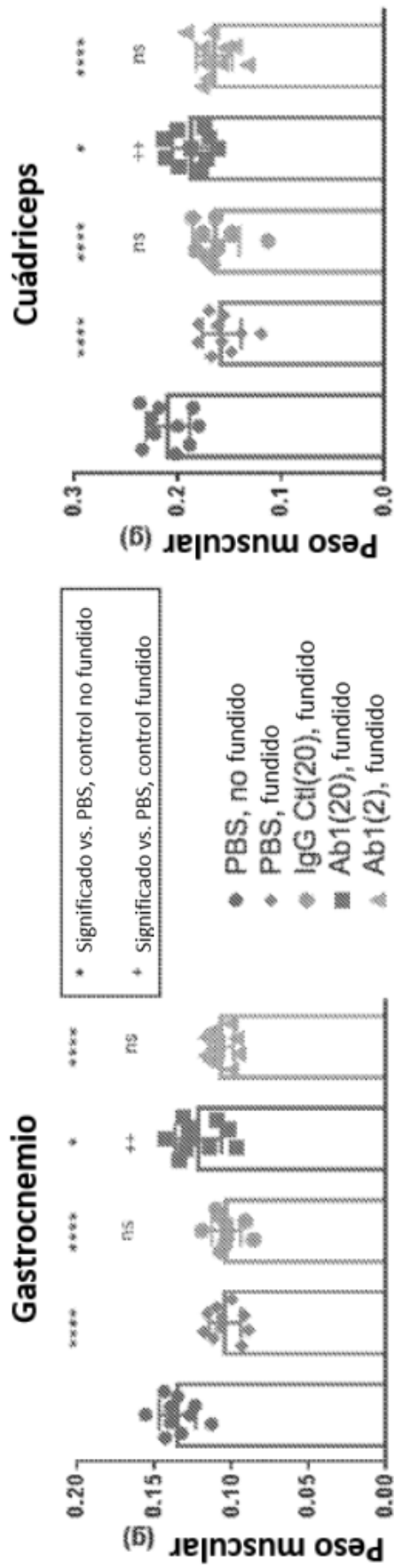


FIG. 14A

FIG. 14B

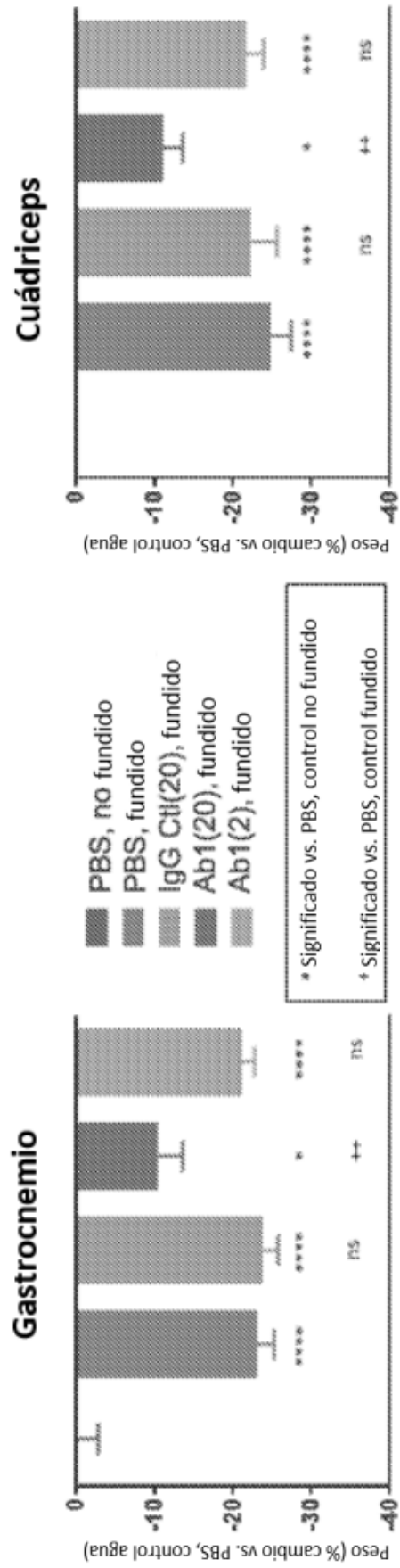


FIG. 14C

FIG. 14D

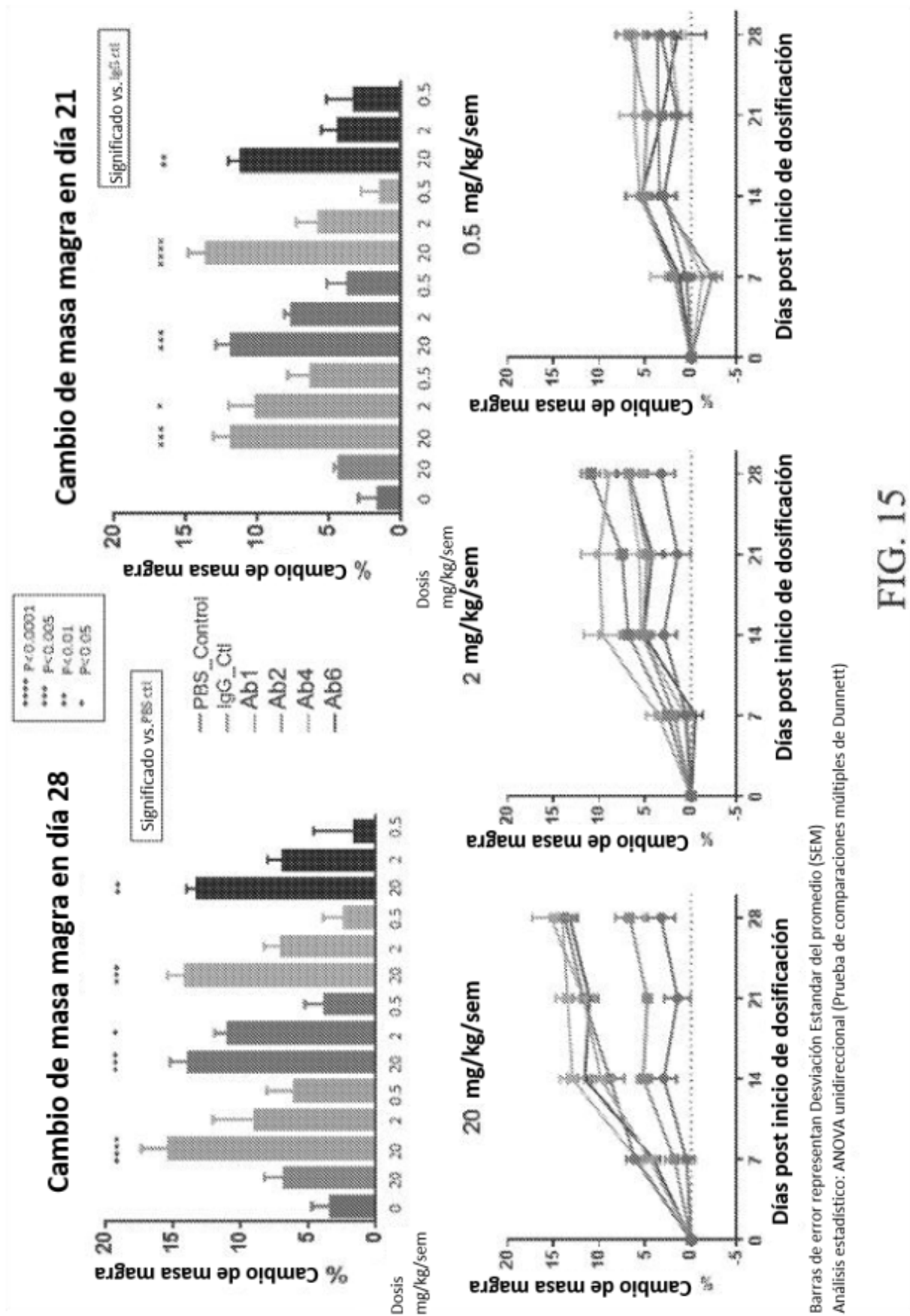
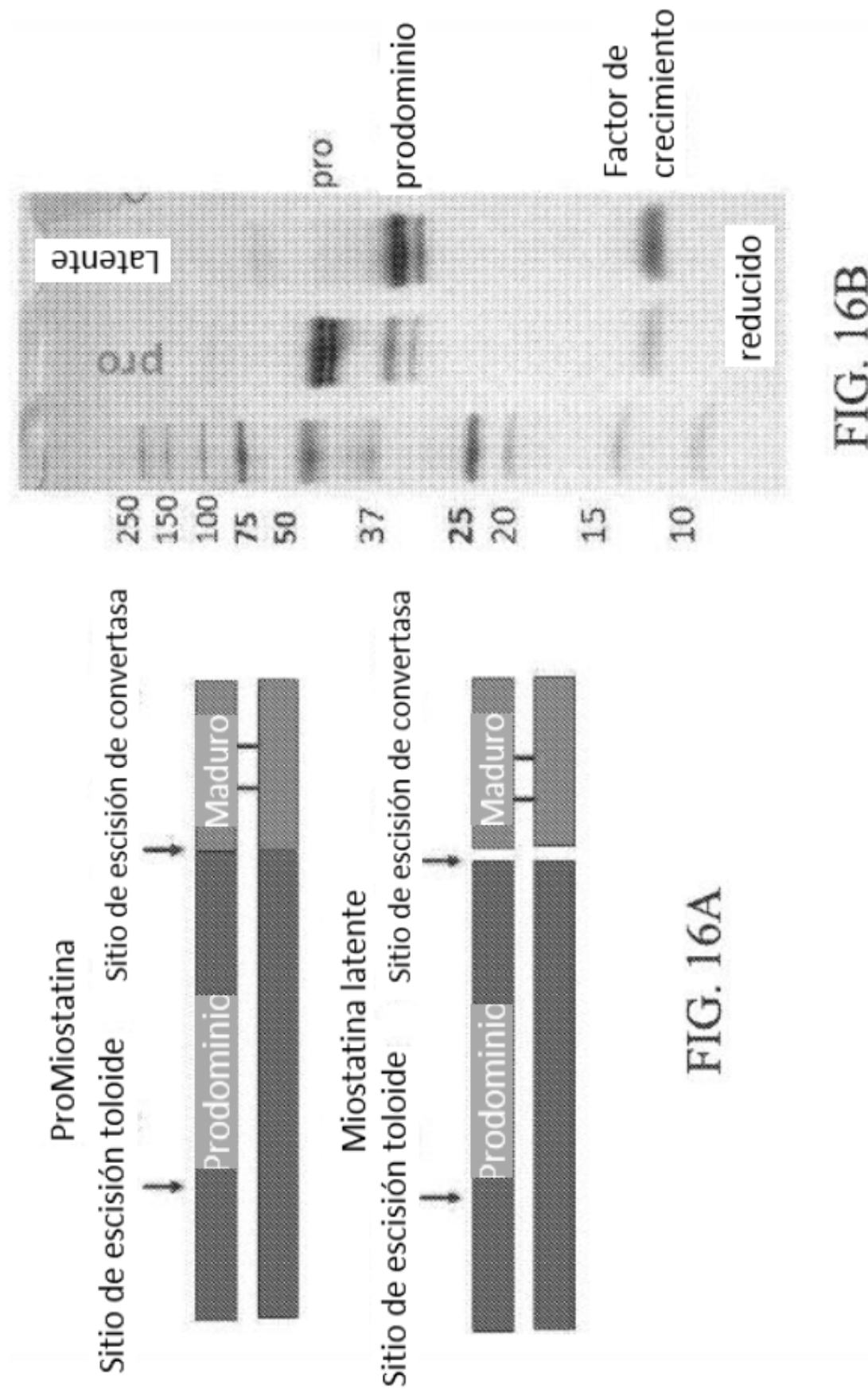


FIG. 15



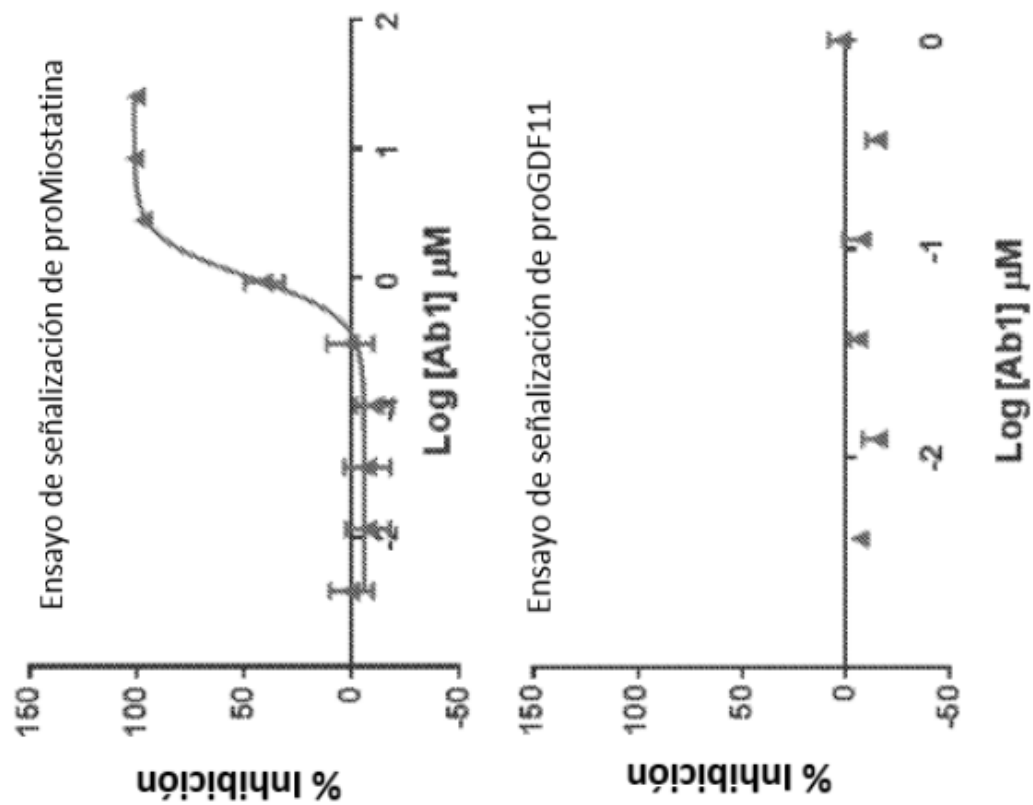


FIG. 17B

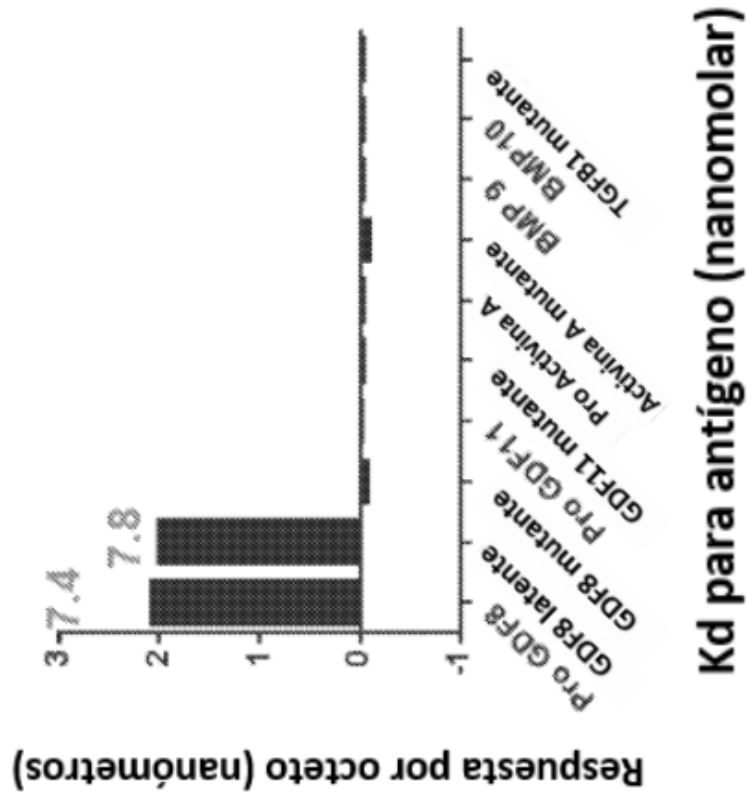


FIG. 17A

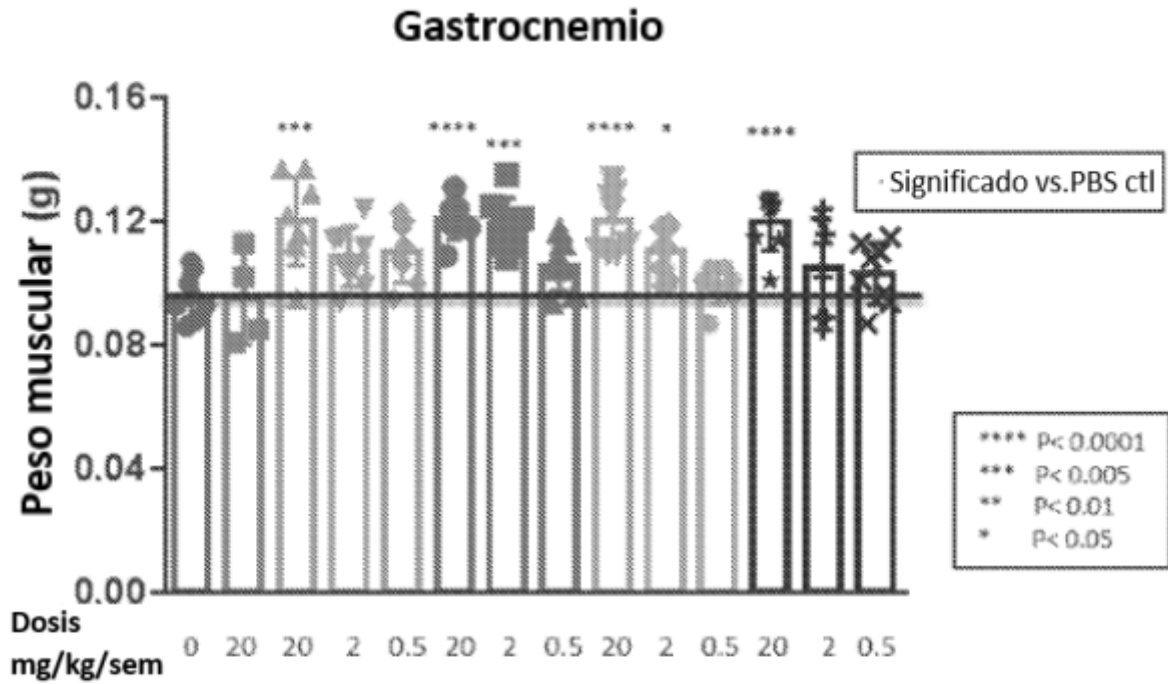


FIG. 18A

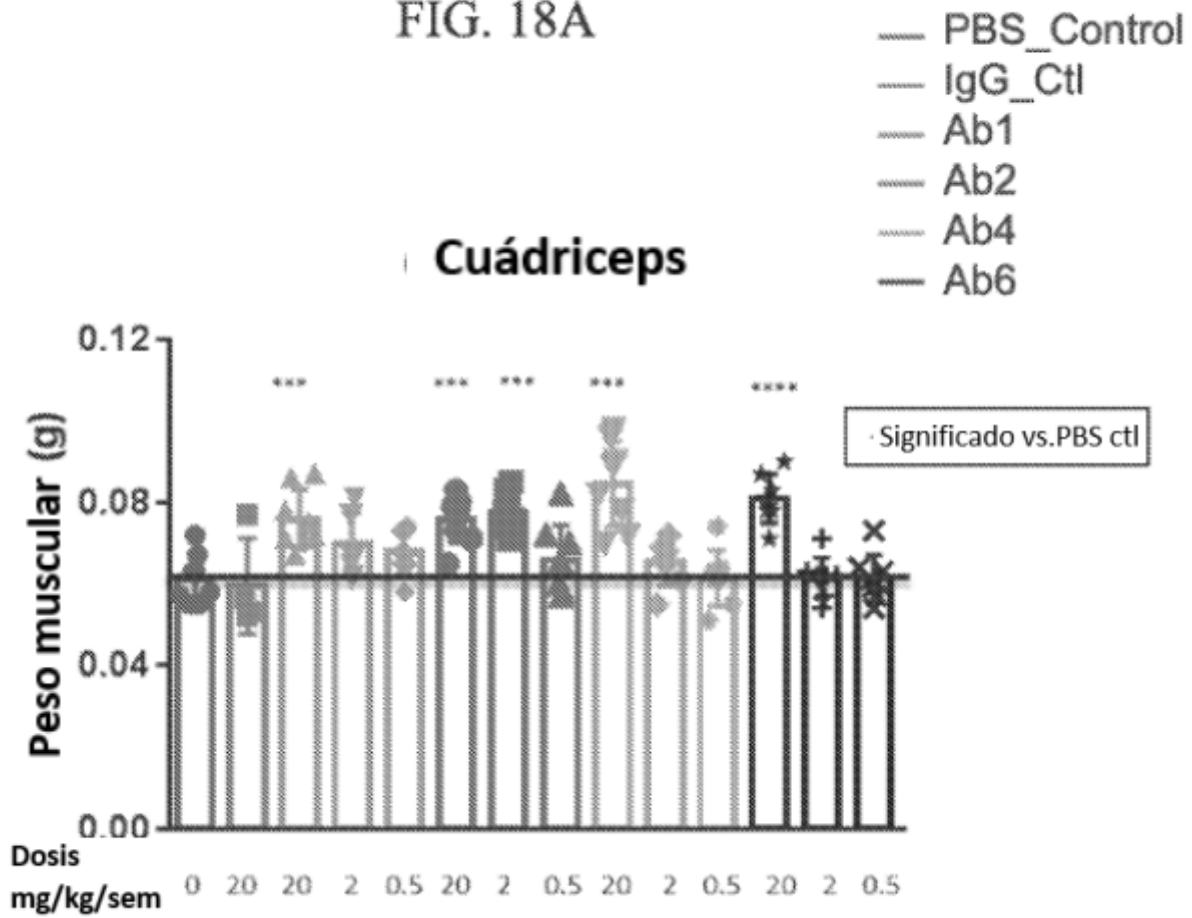


FIG. 18B



Músculo	Ab	PBS_Ctl	20mg/kg/serr	2 mg/kg/serr	0.5mg/kg/serr
Gastrocnemio	Ab1	0	25.1	13.0	14.9
Gastrocnemio	Ab2	0	25.6	24.0	9.8
Gastrocnemio	Ab4	0	25.0	15.0	3.1
Gastrocnemio	Ab6	0	24.8	9.3	7.4
Cuádriceps	Ab1	0	23.9	13.9	10.8
Cuádriceps	Ab2	0	23.9	26.1	7.6
Cuádriceps	Ab4	0	37.8	6.4	0.2
Cuádriceps	Ab6	0	32.0	0.4	0.2

FIG. 18C

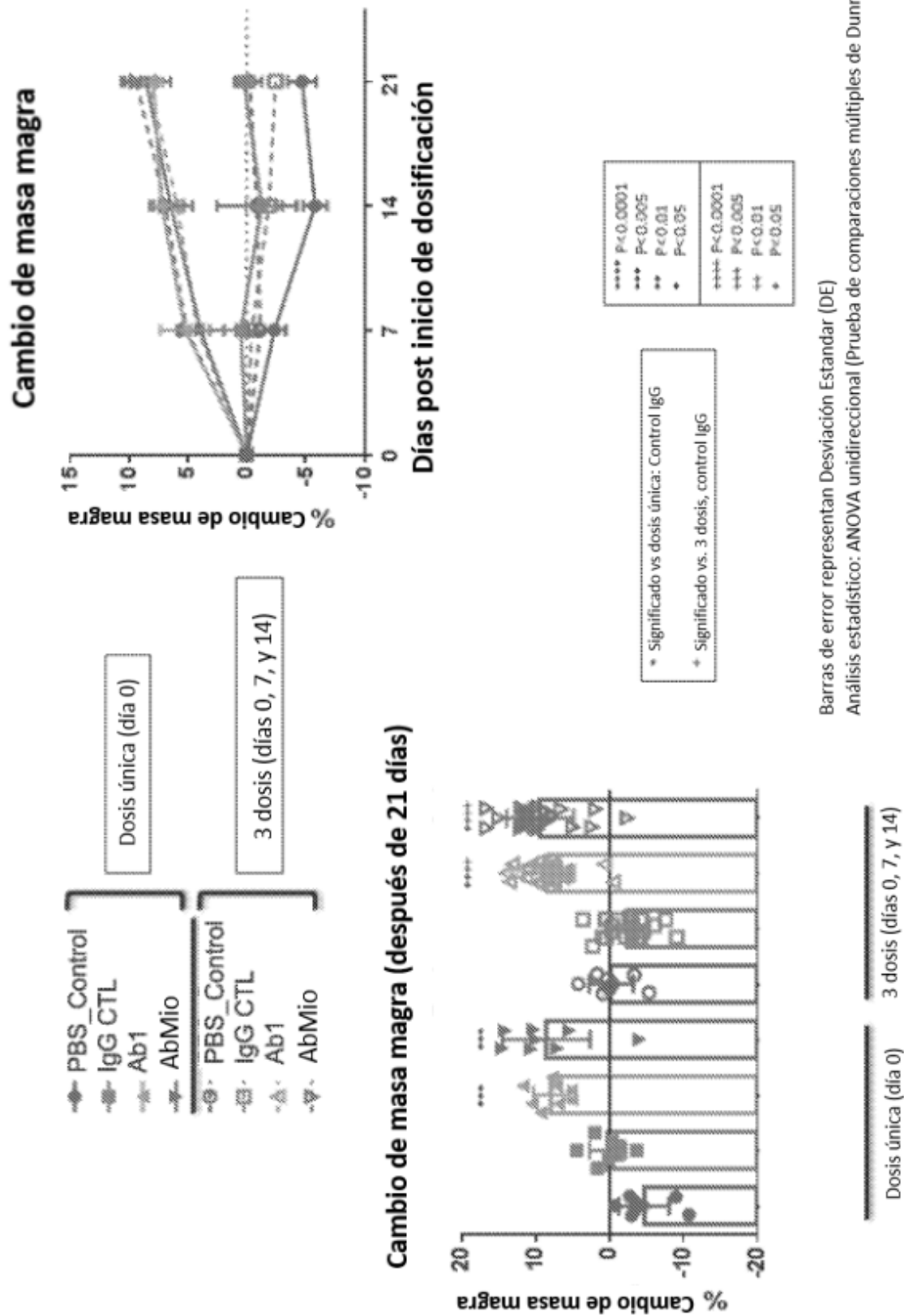


FIG. 19

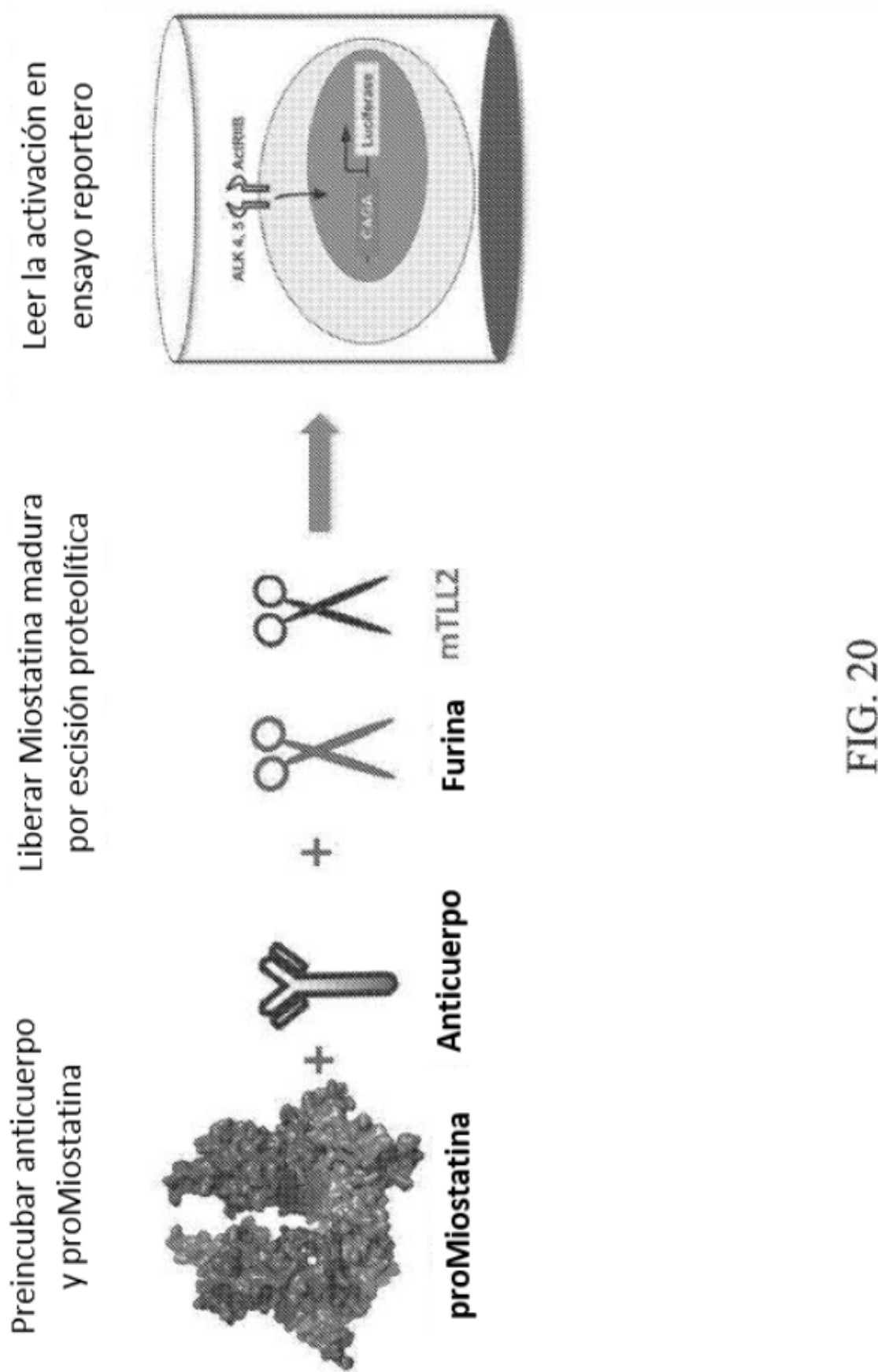


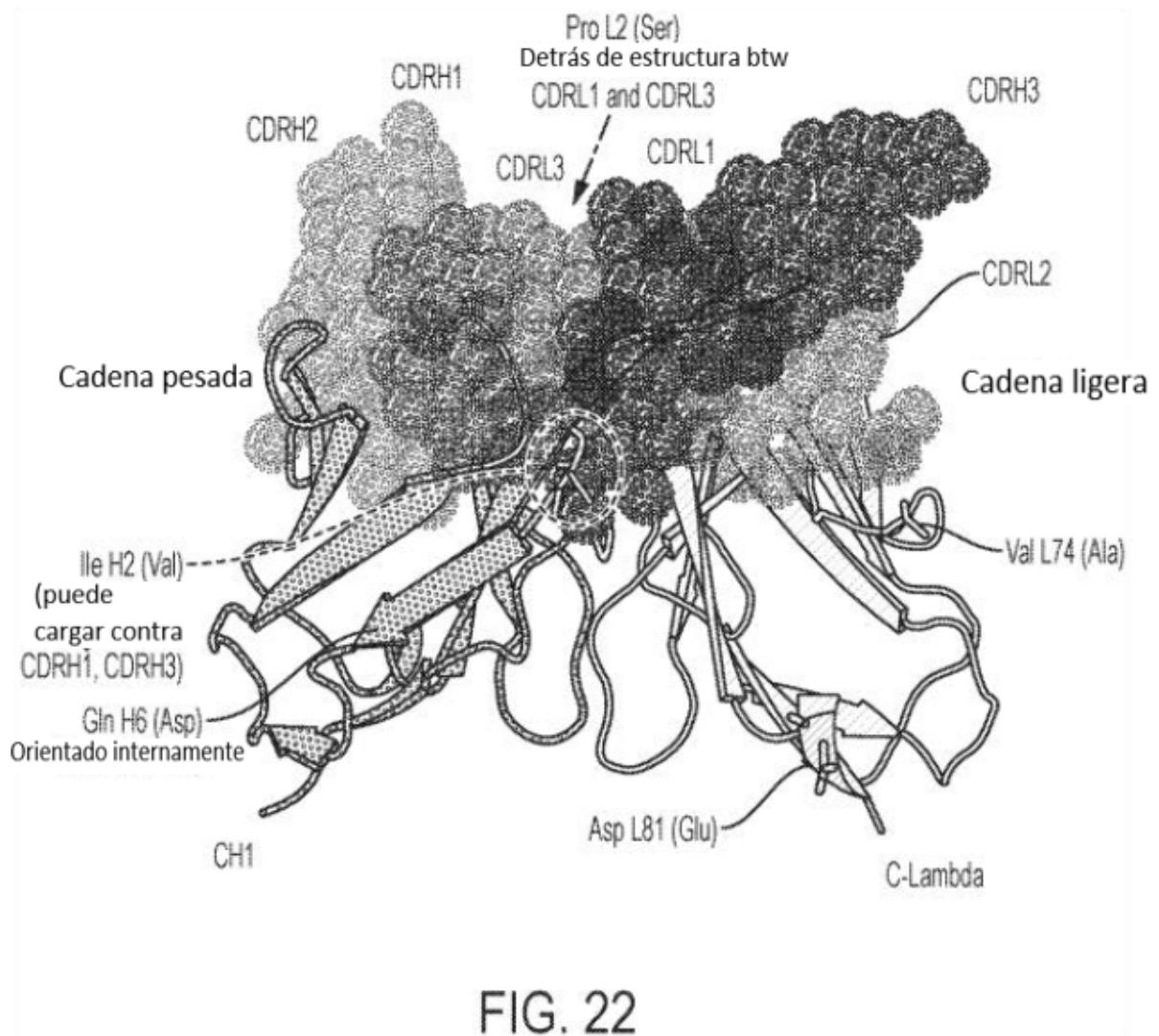
FIG. 20

1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY	60
61	ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLW SHYYGM DVWGQGT	120
121	TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP	180
181	AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF	240
241	LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREE	300
301	QFNSTYRVSVLT V L HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS	360
361	QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK	420
421	SRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG	452

FIG. 21A

1	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRP SGVP	60
61	DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL	120
121	FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY	180
181	LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	215

FIG. 21B



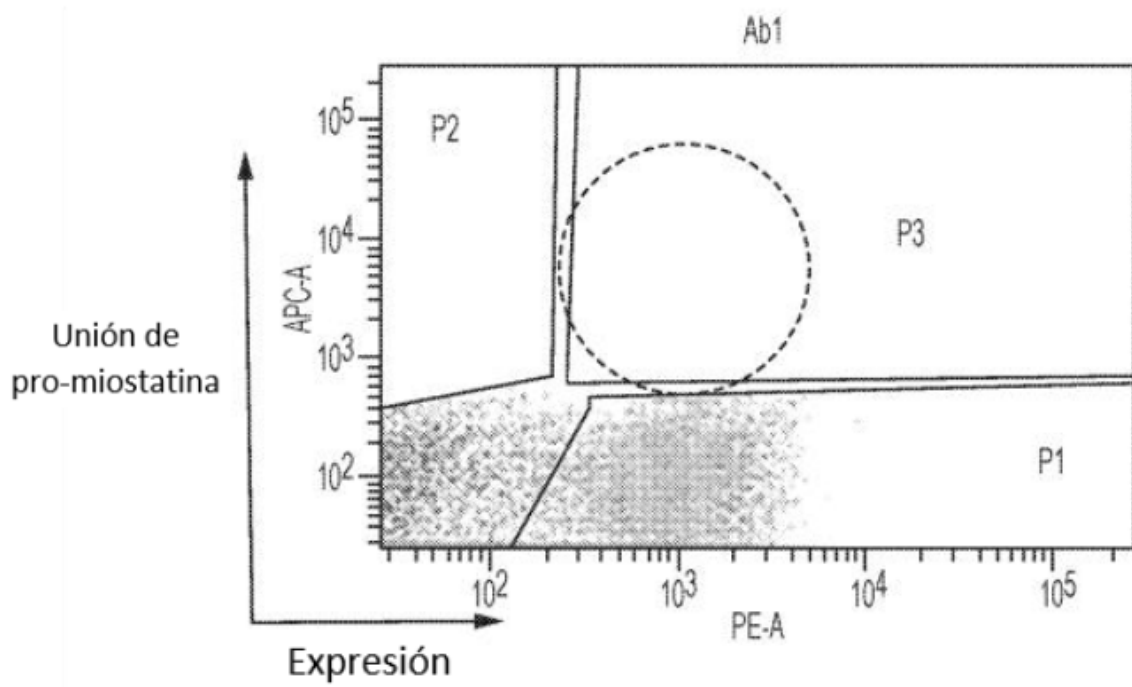


FIG. 23A

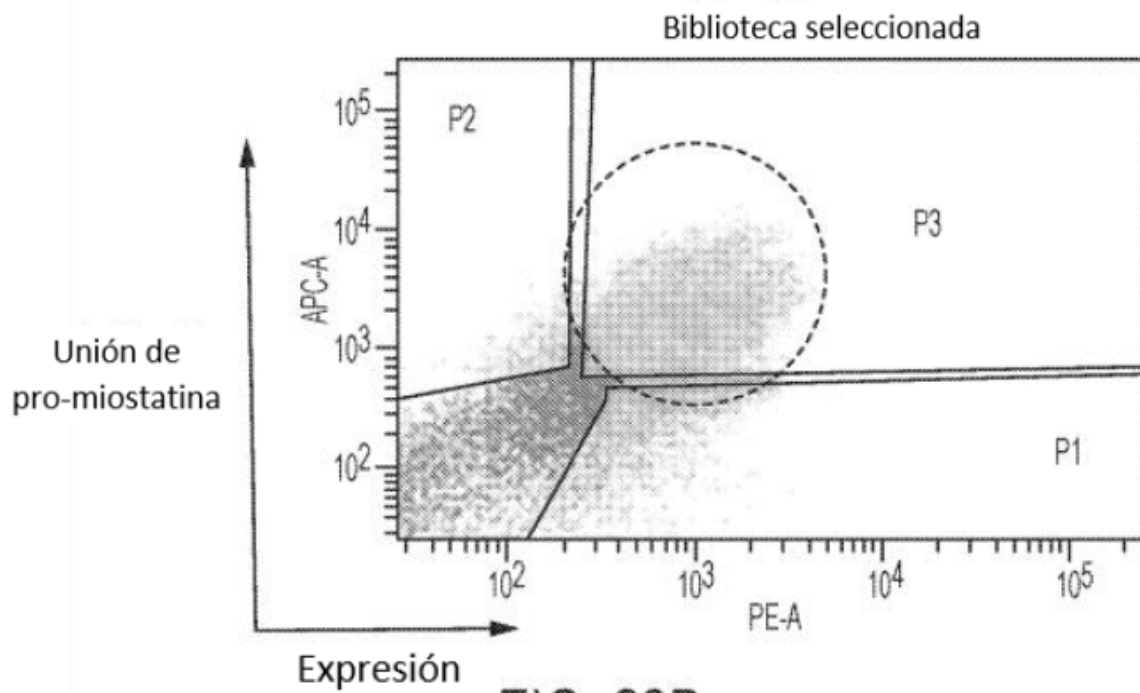
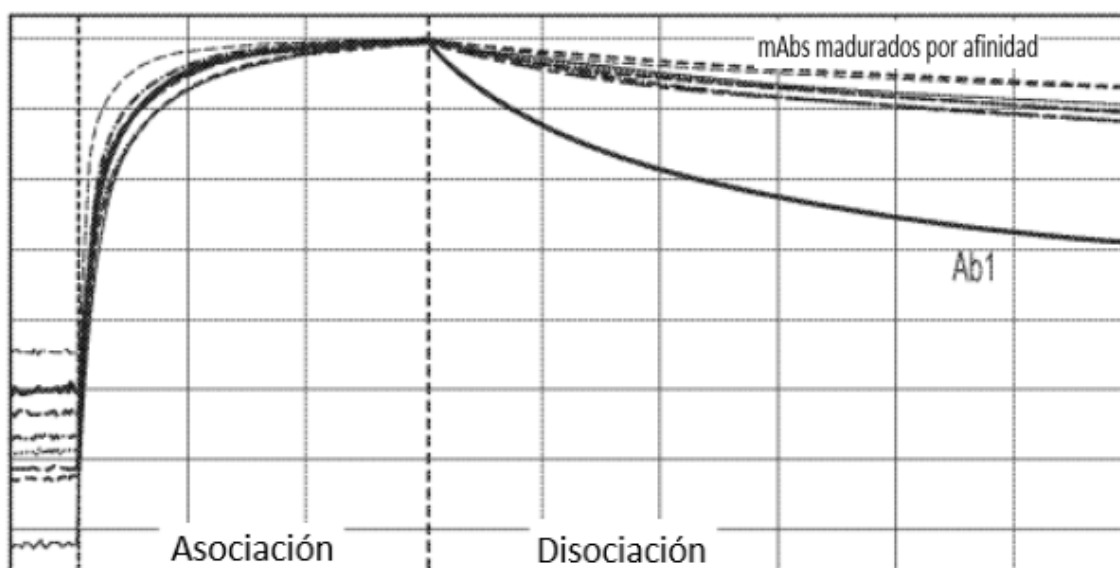


FIG. 23B



**Principales 12 clones seleccionados para caracterización posterior**

Ab1: 4.8 nM

Ab4: 0.47 nM

Mejoría de 10 veces

Ab6: 0.48 nM

Mejoría de 10 veces

Mejor mAb madurado por afinidad: <10 pM

Mejoría de >480 veces

FIG. 23C

	MARCO 1	CDR1	MARCO 2
Ab1	QIQLVQSGGGVVQPGRSRLRLSCAAS	<u>GFTFSSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab3	QIQLVQSGGGVVQPGRSRLRLSCAAS	<u>GFAFSSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab5	QIQLVQSGGGVVQPGRSRLRLSCAAS	<u>GFAFSSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA

	CDR2	MARCO 3
Ab1	<u>VISYDGSN</u> KYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN
Ab3	<u>VISYDGS</u> IKYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN
Ab5	<u>VISYDGSN</u> KYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN

	CDR3	MARCO 4
Ab1	<u>DLLVRFLEWSHYYGMDV</u>	WGQGT
Ab3	<u>DLLVRFLEWSHKYGMDV</u>	WGQGT
Ab5	<u>DLLVRFLEWSHKYGMDV</u>	WGQGT

FIG. 24A

	MARCO 1	CDR1	FRW2
Ab1	QPVLTQPPSASGTPGQRV	<u>TISCSGSSNIGSNT</u>	VHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab3	QPVLTQPPSASGTPGQRV	<u>TISCSGSTSNIGSNT</u>	VHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab5	QPVLTQPPSASGTPGQRV	<u>TISCSGSSNIGGNT</u>	VHWYQQLPGTAPKLLIY

	CDR2	MARCO 3
Ab1	<u>SDNQRP</u> SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab3	<u>SDDQRP</u> SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab5	<u>SDDQRP</u> SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	

	CDR3	MARCO 4
Ab1	<u>AAWDDSLNGV</u>	FGGGTKLTVL
Ab3	<u>AAWDESLNGV</u>	FGGGTKLTVL
Ab5	<u>AAWDESLNGV</u>	FGGGTKLTVL

FIG. 24B



*Cambios de miostatina durante atrofia muscular inducida por dexametasona*

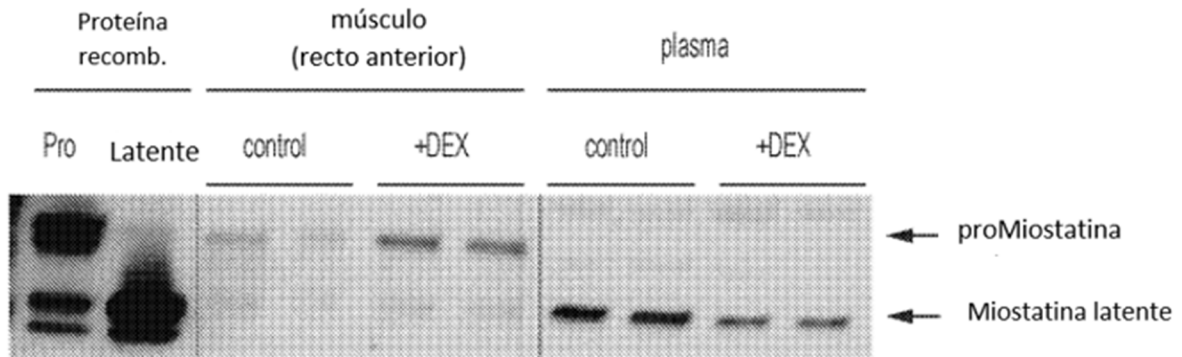


FIG. 25

*Cuantificación de cambios en miostatina durante atrofia muscular inducida por dexametasona*  
*transferencia Western fluorescente (Azure Imager) – Proteína normalizada a total cargada por carril*

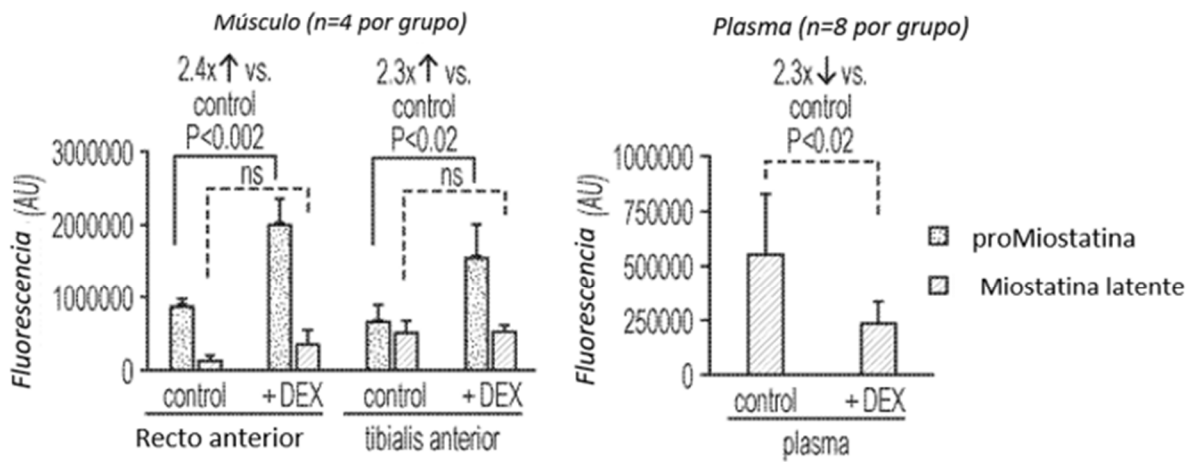


FIG. 26

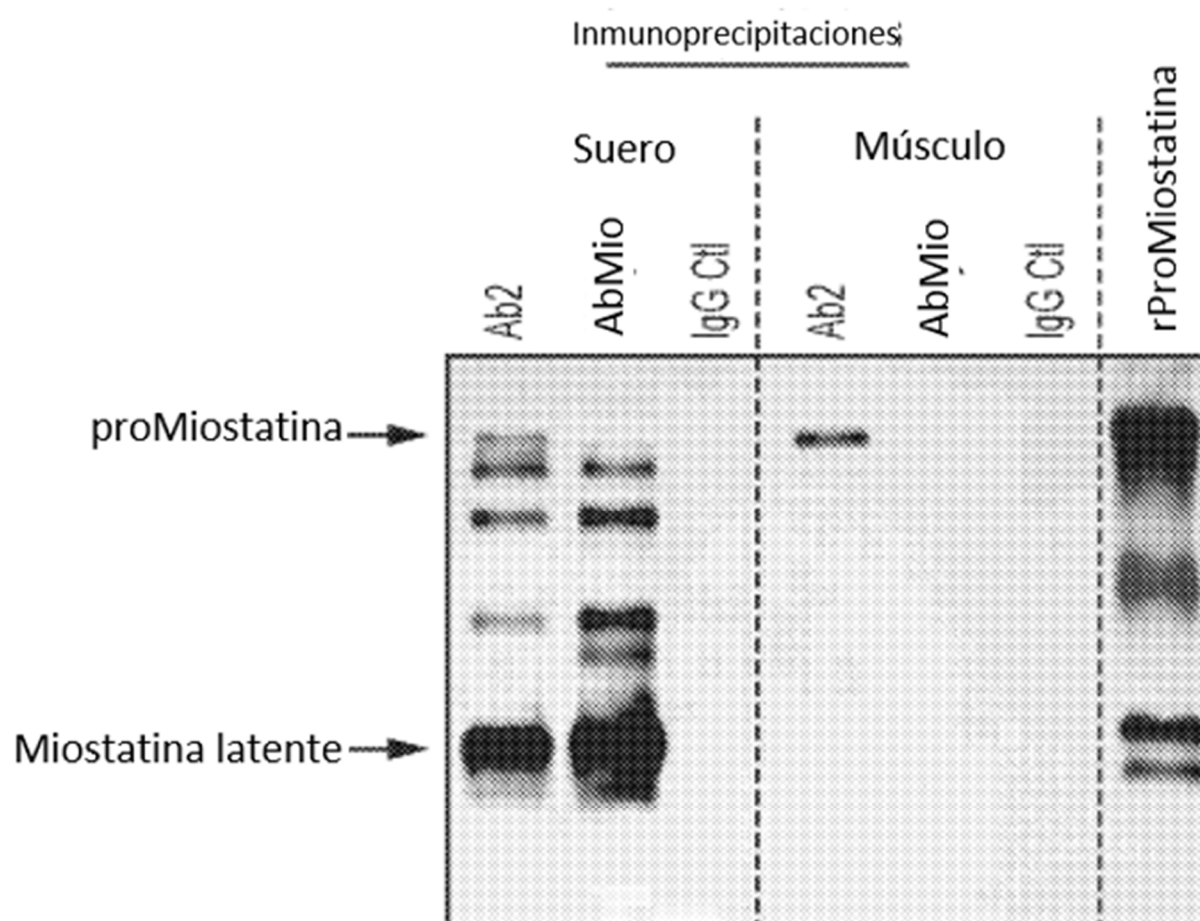


FIG. 27

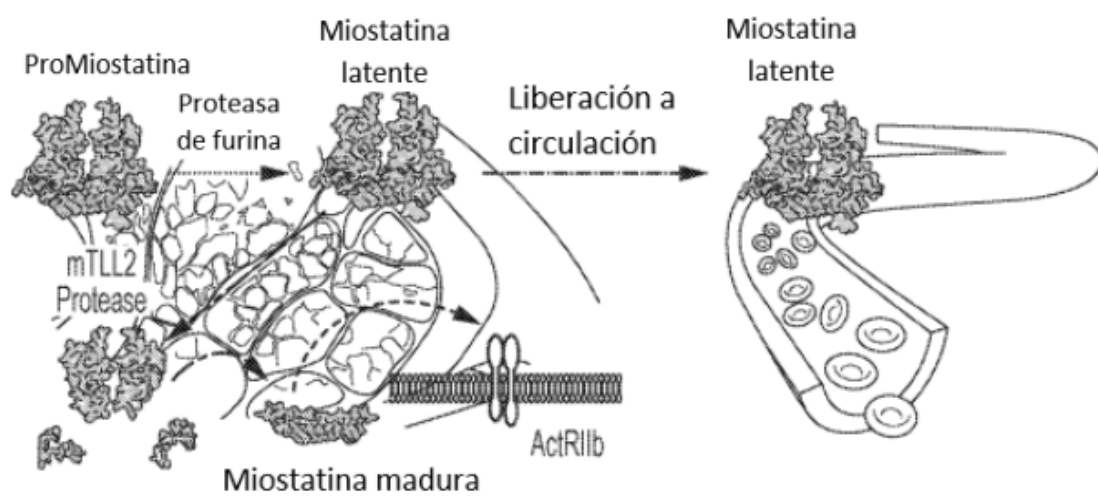


FIG. 28A

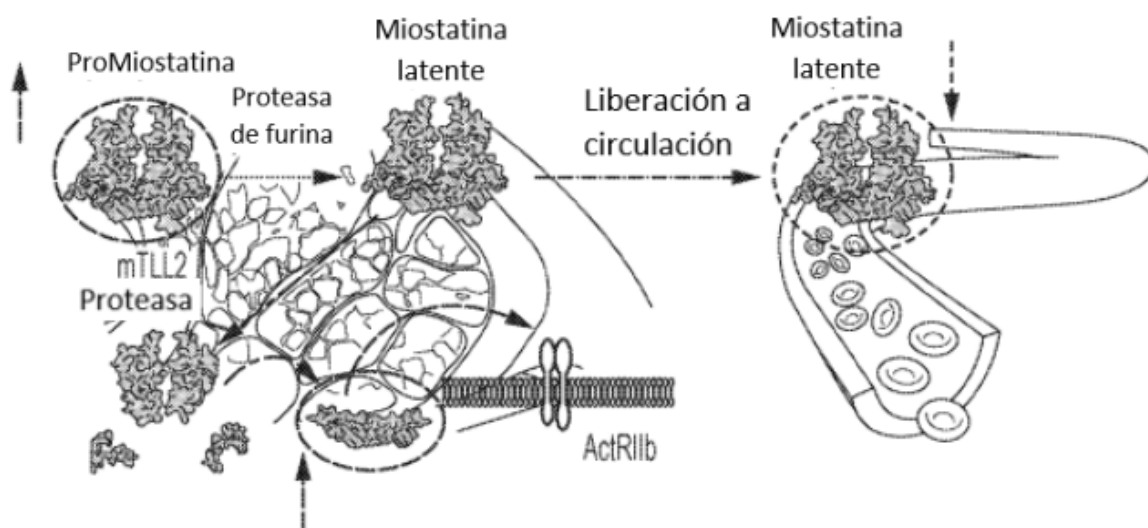


FIG. 28B

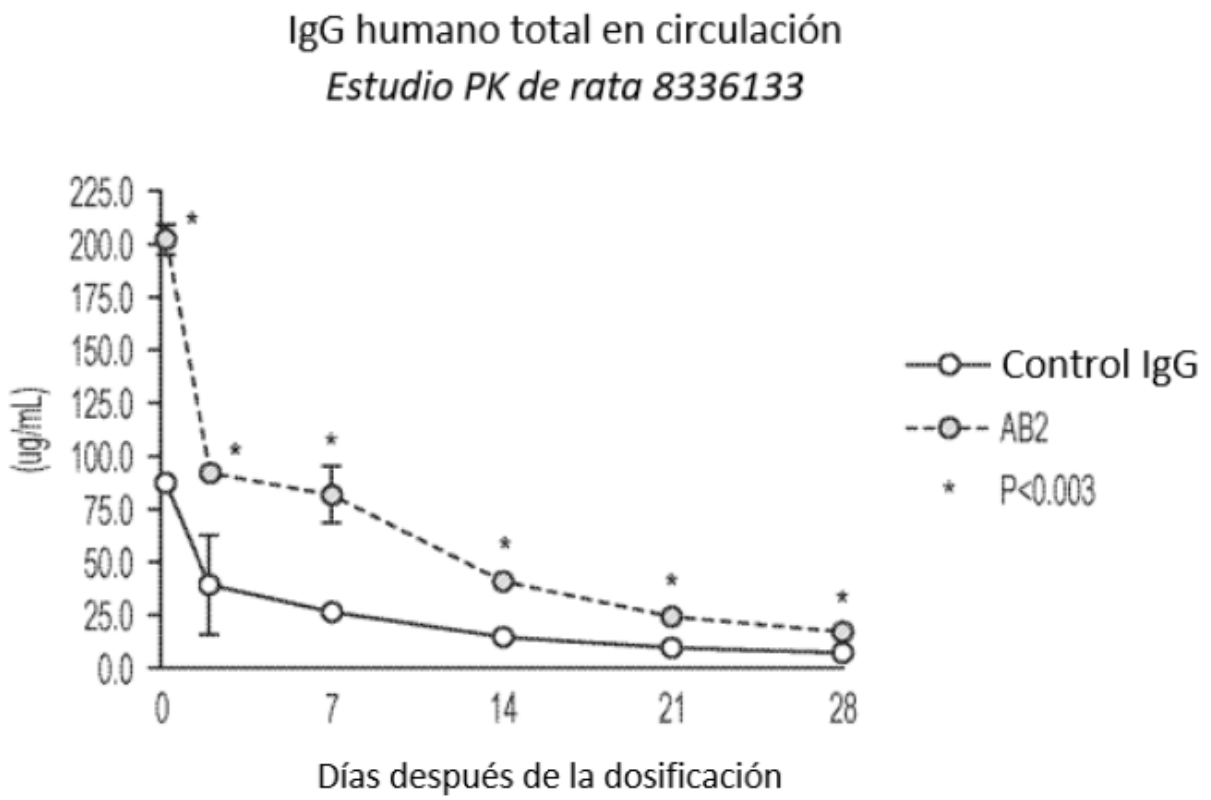


FIG. 29

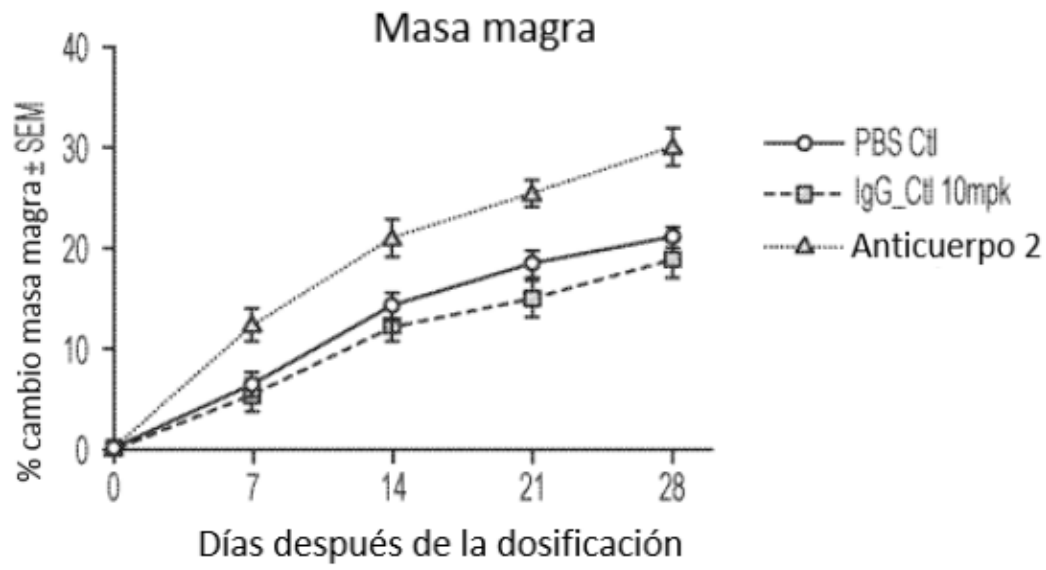


FIG. 30A

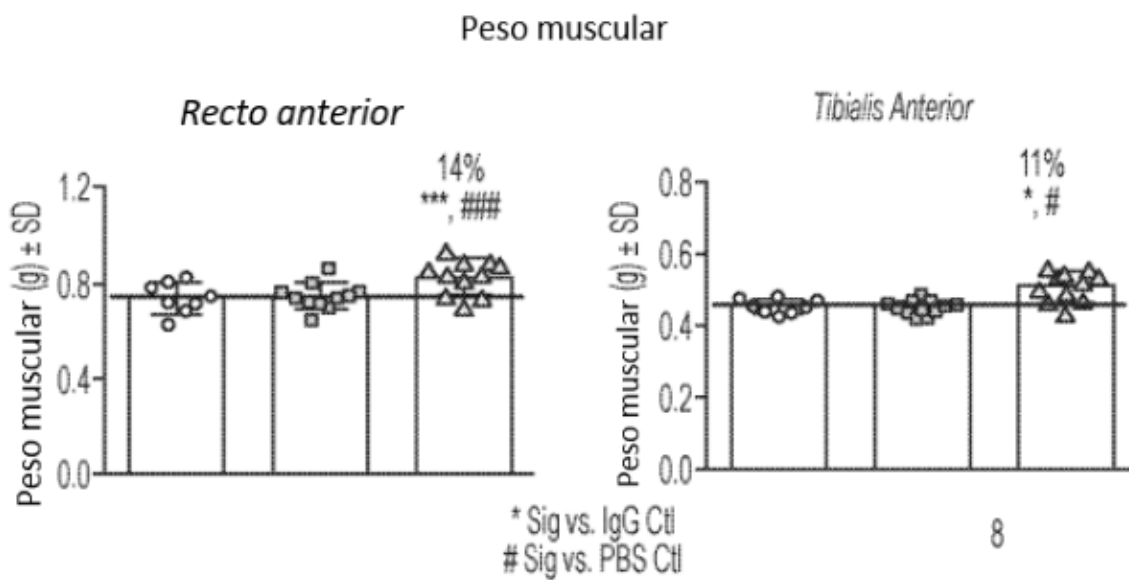


FIG. 30B

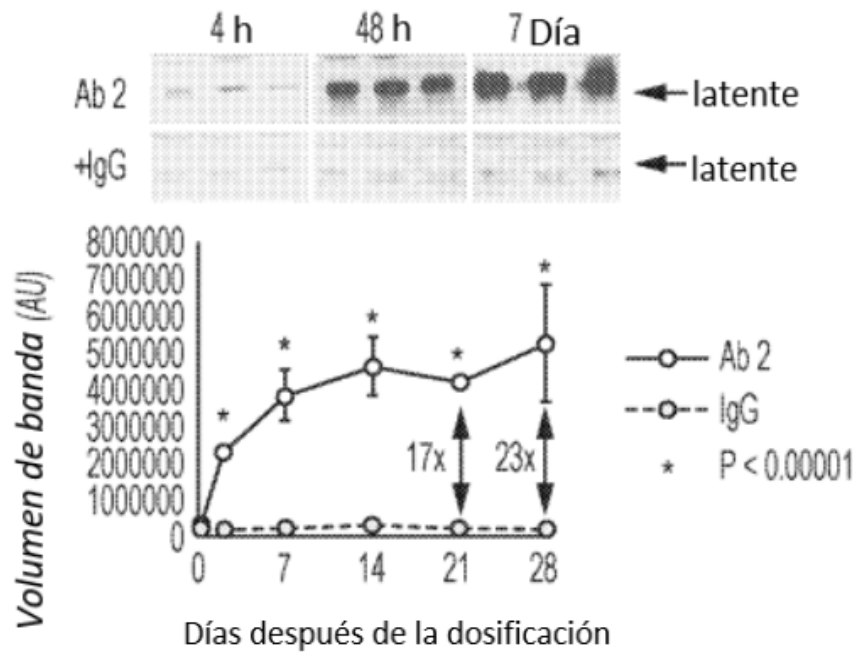


FIG. 31A

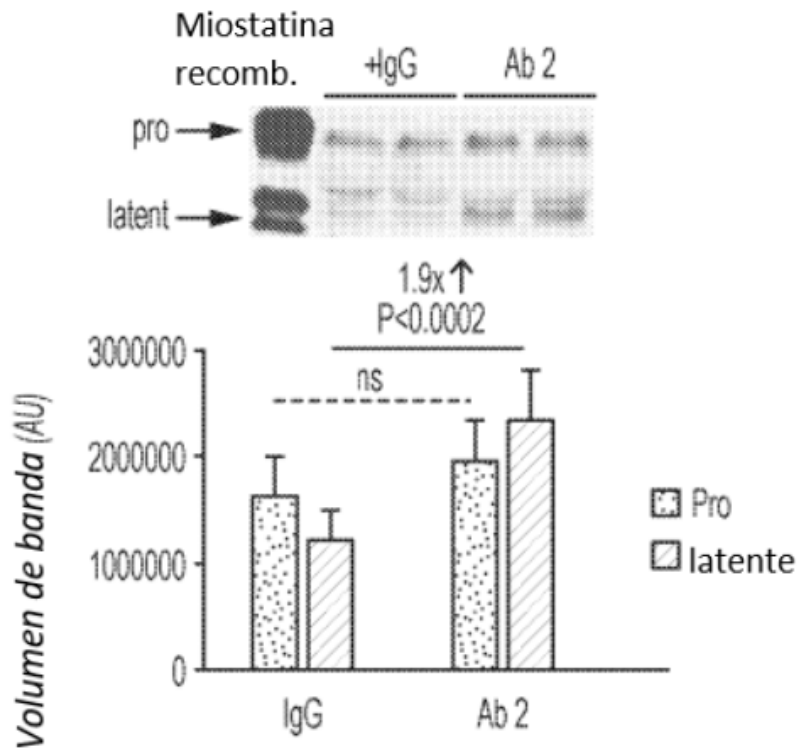


FIG. 31B

*Duración aumentada de incremento de masa magra en ratones tratados con Ab2*

*% cambio en masa magra vs. día 0  
medido por 1RMN, N=4 a 8 por grupo*

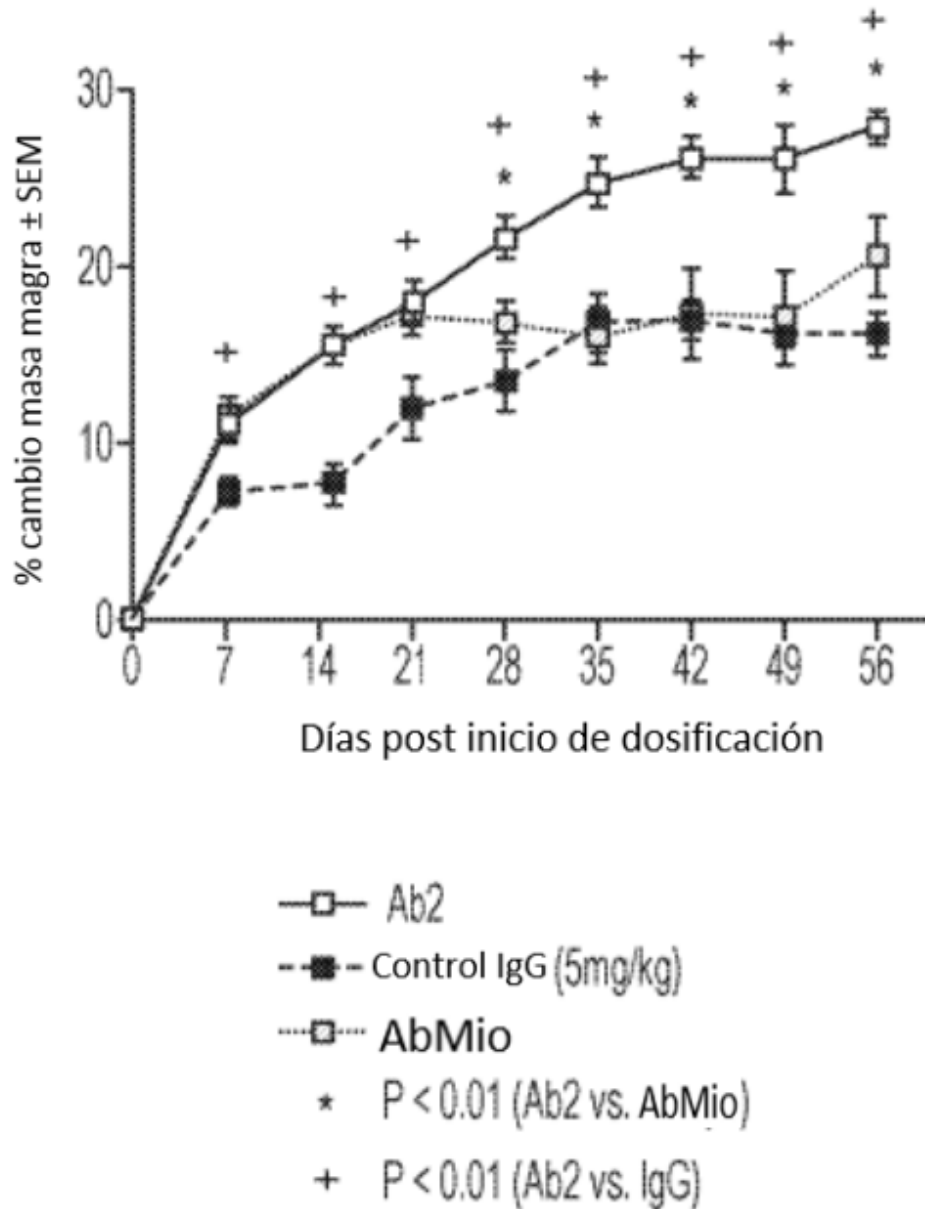
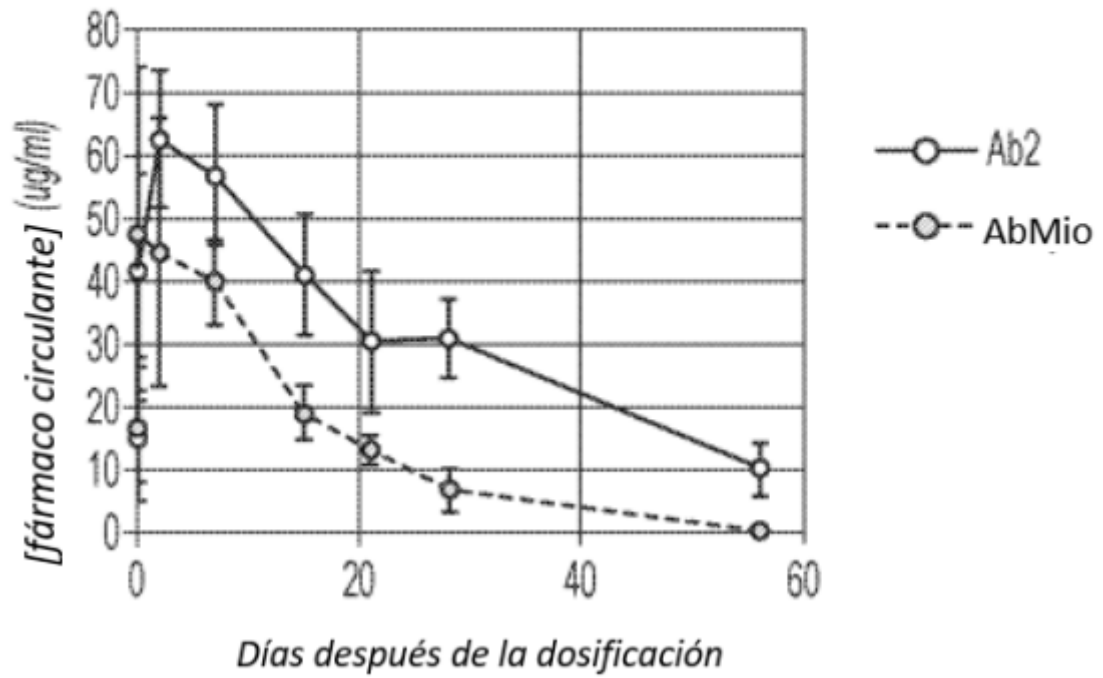


FIG. 32

*Ab2 exhibe exposición superior vs. AbMio en suero SCID  
IgG  $\alpha$ -humano ELISA, N=4 por grupo*



	$t_{1/2}$ (día)	$AUC_{INF}$ (día* $\mu\text{g/mL}$ )
AbMio	8.2	773
Ab2	20.3	2072

FIG. 33



*Ab2 y AbMio tienen efectos similares  
en miostatina latente circulante*

*Miostatina latente en suero  
Western cuantitativo, N=3 por grupo*

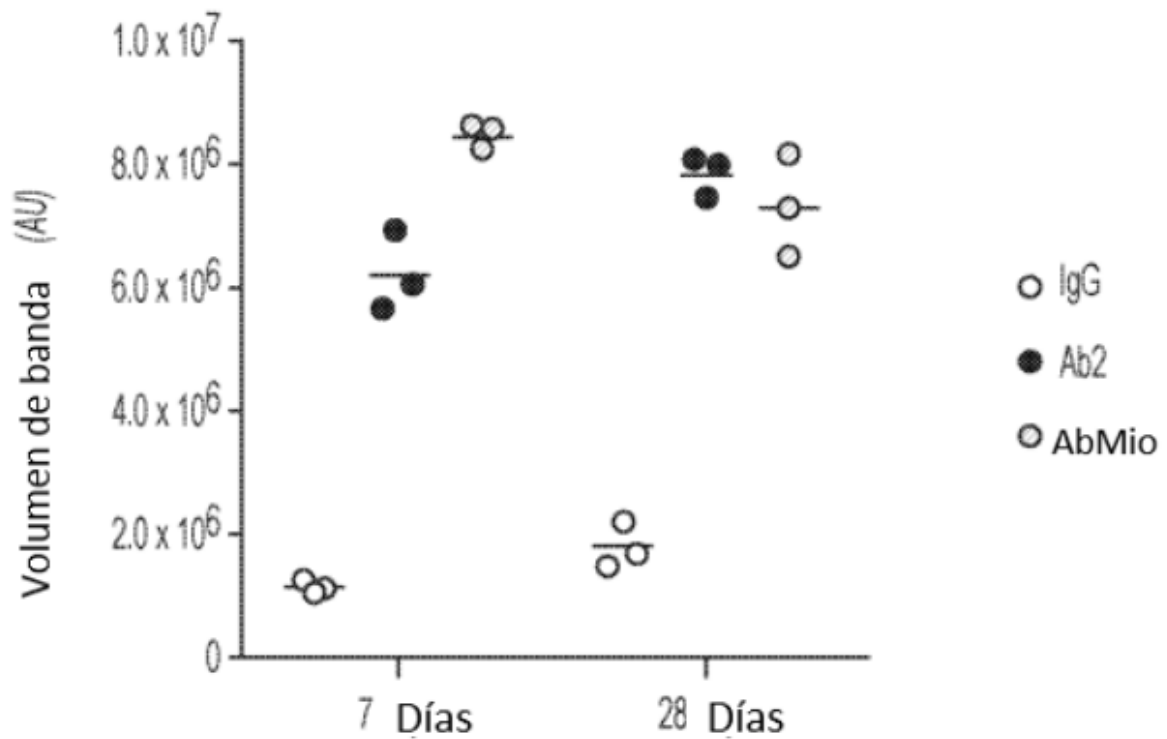


FIG. 34

Miostatina latente muscular en ratones tratados con Ab2 y AbMio

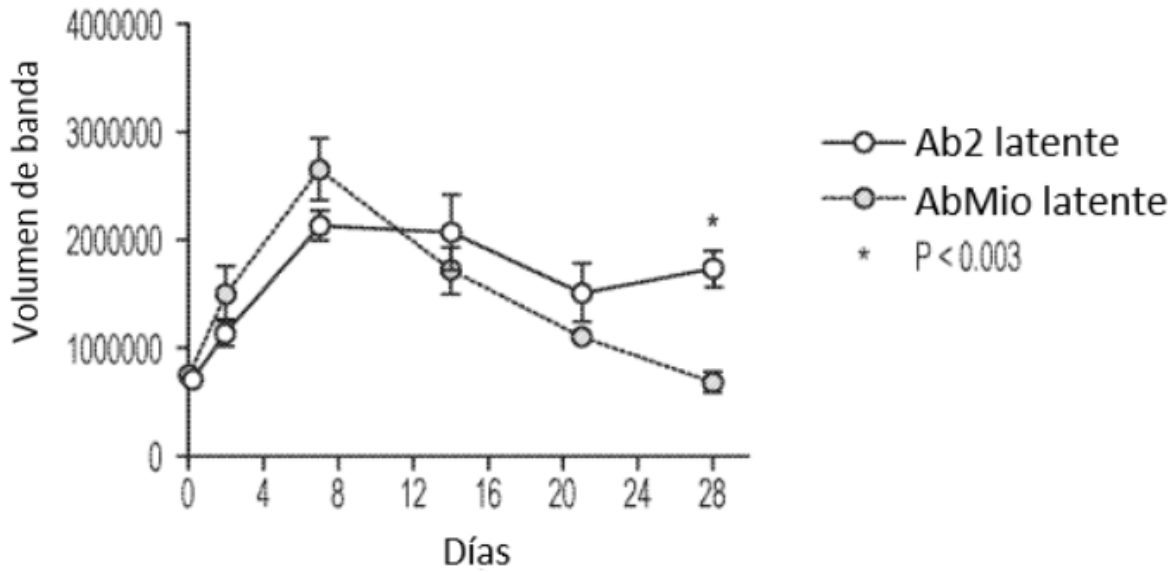


FIG. 35A

ProMiostatina muscular en ratones tratados con Ab2 y AbMio

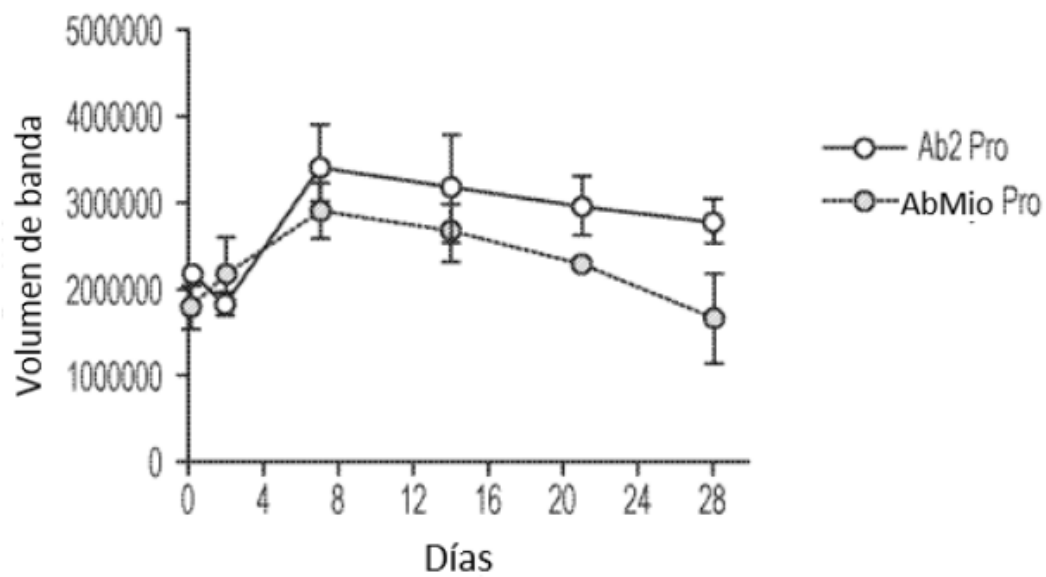


FIG. 35B

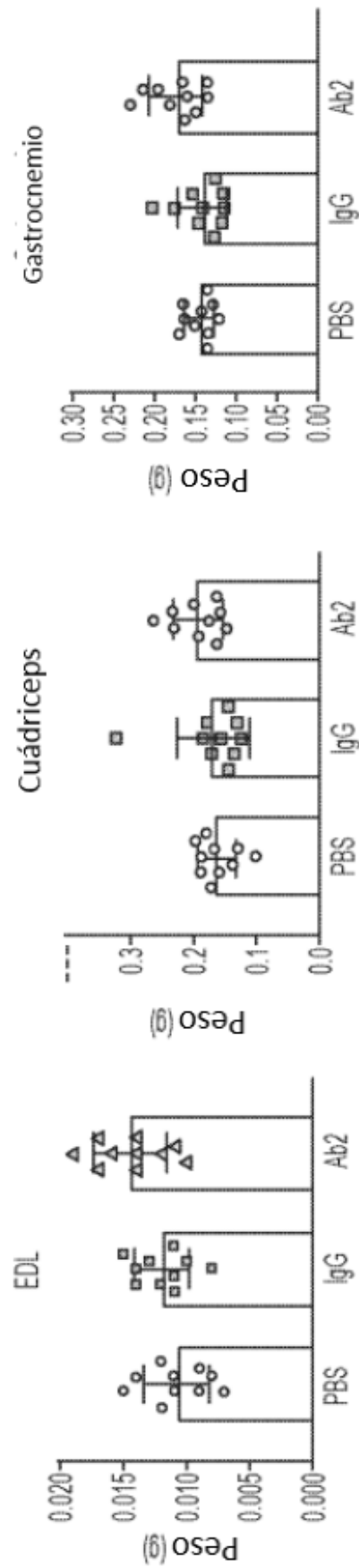


FIG. 36A

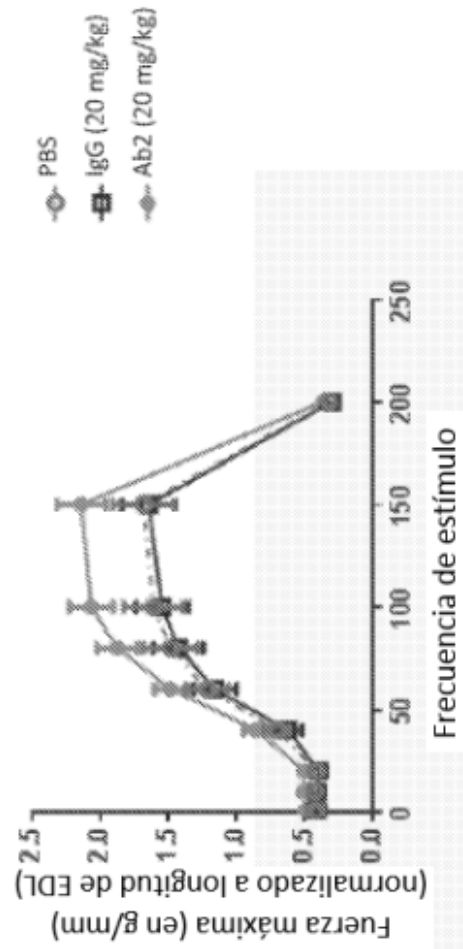


FIG. 36B