

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480022134.8

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 9 月 6 日

[11] 公开号 CN 1829532A

[22] 申请日 2004.6.1

[21] 申请号 200480022134.8

[30] 优先权

[32] 2003.6.2 [33] US [31] 60/474,603

[86] 国际申请 PCT/US2004/017049 2004.6.1

[87] 国际公布 WO2004/108157 英 2004.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.28

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 L. - A. 怀特穆尔 李湘萍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 李连涛

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 1 页
按照条约第 19 条的修改 3 页

[54] 发明名称

肌肉抑制素(GDF8)抑制剂和皮质类固醇联合用于治疗神经肌肉紊乱的用途

[57] 摘要

本公开内容提供了治疗哺乳动物中神经肌肉紊乱的方法。所公开的方法包括对易受或者患有神经肌肉紊乱的受试者施用治疗有效量的 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇,从而保持肌肉功能的所希望的水平。

1. 治疗肌肉功能减弱的哺乳动物的方法，其包含对所述哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗肌肉功能的减弱。

2. 权利要求 1 的方法，其中通过选自肌肉量、肌肉收缩力、血清 CK 浓度或者肌肉形态学的至少一种参数评估至少一种肌肉的肌肉功能。

3. 权利要求 1 的方法，其中治疗其功能的肌肉选自腓肠肌、胫骨前肌、四头肌、指长伸肌、心肌或者隔肌的至少一种。

4. 权利要求 1 的方法，其中治疗所述哺乳动物导致所述哺乳动物的体重增加。

5. 权利要求 1 的方法，其中治疗所述哺乳动物导致抓握力量增加。

6. 治疗肌无力的方法，其包括对哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗肌肉强度的丧失。

7. 治疗皮质类固醇诱导的肌萎缩的方法，其包括对哺乳动物施用足以治疗皮质类固醇诱导的肌萎缩的治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂。

8. 治疗神经肌肉紊乱的方法，其包括对患有或者有危险患有神经肌肉紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗所述神经肌肉紊乱。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述神经肌肉紊乱是肌营养不良。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述肌营养不良是杜兴肌营养不良。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述肌营养不良是贝克尔肌营养不良。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述哺乳动物是人。

13. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述皮质类固醇选自：(a) 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的松或曲安奈德的至少一种；(b) 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的

松或曲安奈德的至少一种的衍生物；或（c）倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的松或曲安奈德的至少一种的药学上可接受的盐的至少一种。

14. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述皮质类固醇是强的松或者强的松龙。

15. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述皮质类固醇以 0.1 到 2.0mg/kg/天的剂量施用。

16. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中经口施用所述皮质类固醇。

17. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂选自针对 GDF-8 的抗体、针对 GDF-8 受体的抗体、可溶性 GDF-8 受体、GDF-8 前肽、GDF-8 的小分子抑制剂、卵泡抑素或者含有卵泡抑素结构域的蛋白质。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述针对 GDF-8 的抗体选自 JA-16、Myo29、Myo28 或 Myo22。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 前肽在天冬氨酸残基处突变。

20. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 前肽连接免疫球蛋白的 Fc 部分。

21. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 受体是 ActRIIB。

22. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 受体连接免疫球蛋白的 Fc 部分。

23. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂是卵泡抑素。

24. 权利要求 17 的方法，其中所述含有卵泡抑素结构域的蛋白质是 GASP-1。

25. 权利要求 17 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂是小分子抑制剂。

25. 权利要求 1 的方法，其中所述方法导致所述哺乳动物的心脏病的治疗。

26. 权利要求 1 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是同时的。

27. 权利要求 1 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是顺序的。

28. 权利要求 8 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是同时的。

29. 权利要求 8 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是顺序的。

肌肉抑制素 (GDF8) 抑制剂和皮质类固醇联合 用于治疗神经肌肉紊乱的用途

本申请要求 2003 年 6 月 2 日提交的美国临时申请号 60/474,603 的优先权, 此处完整引用所述该临时申请作为本文的参考。

发明领域

本发明涉及临床病理生理学领域, 更具体地涉及治疗神经肌肉紊乱, 如肌营养不良的方法。本发明还涉及含有皮质类固醇和生长和分化抑制剂的药物制剂。

发明背景

肌营养不良 (MD) 是进行性遗传的神经肌肉紊乱, 其特征是肌肉消瘦和肌无力 (Emery (2002) The Lancet, 359: 687-695)。许多形式的肌营养不良是致命的并且当前不能治愈的。

杜兴肌营养不良 (DMD) 是最常见的 X-连锁的神经肌肉疾病。该疾病由编码肌营养不良蛋白的 DMD 基因的突变引起。该蛋白质的改变或者缺失导致异常肌纤维膜撕裂。近侧肌肉中肌纤维直径的异常改变 (萎缩性和肥大纤维) 和进行性肌肉损伤是该疾病的标志。受损的肌肉释放细胞内酶肌酸激酶 (CK)。结果, DMD 患者中血清 CK 水平特征为很高 (最高达正常水平的 10 倍)。组织炎症、肌纤维坏死和纤维脂肪组织对肌肉的更替的复合作用导致该病理生理级联。

DMD 基因的另一等位基因变体导致 MD 的较轻的形式, 其称作贝克尔肌营养不良 (BMD)。BMD 在临床上与 DMD 相似, 但是症状的发作在生命中较晚出现。

已经在 MD 中尝试了许多药理学试剂, 但是没有一种被证明可以有效抑制所述疾病的进程。当前的治疗形式仍然处于理疗和康复领域。

使用皮质类固醇 (例如, 强的松和/或其衍生物) 的许多试验已经表明患有 MD 个体的改善, 尤其短期改善。尽管皮质类固醇减轻该疾病表型的确切机制还不清楚, 但是认为皮质类固醇通过减轻炎症、抑制免疫系统、改善钙体内稳态、上调代偿性蛋白质的表达, 和增加成

肌细胞增殖来发挥作用(Khurana 等人(2003)Nat. Rev. Drug Discovery 2: 279-386)。然而, 随时间推移施用皮质类固醇可以诱导肌萎缩, 其主要影响近侧肌肉——在 DMD 和 BMD 中受影响的相同的肌肉。皮质类固醇诱导的肌肉和其他副作用限制了皮质类固醇治疗的长期有效性。

GDF-8 是 TGF- β 超家族的成员并且作为肌肉生长的负调节剂起作用。类似于该超家族的其他成员, GDF-8 以前体分子合成, 但是在分泌前, 该前体分子被切割成 N-末端抑制性前肽和 C 末端活性成熟的 GDF-8。前肽可以保持结合 GDF-8, 从而抑制成熟 GDF-8 的生物学活性。前肽必须从复合体解离以便 GDF-8 结合激活蛋白 II 型受体 (ActRIIB)。结合后, ActRIIB 启动信号传导级联, 最终导致成肌细胞发展的抑制。已经表明在体内 GDF-8 的抗体介导的抑制显著增加正常成年小鼠中骨骼肌大小 (Whittemore 等人 (2003) BBRC, 300: 965-971) 和减轻 DMD 的 *mdx* 小鼠模型中的营养不良表型 (Bogdanovich 等人 (2002) Nature, 420 (28): 418-421)。

发明概述

本发明的一个目的是提供治疗特征是或者与肌肉功能减弱的危险相关的紊乱的方法和组合物。本发明的其他目的将在下面说明书中部分给出, 并且部分从该说明书可以理解, 或者可以通过实施本发明而知道。

本发明部分基于如下发现和阐明: 在 DMD 的小鼠模型中, 通过施用中和性抗 - GDF-8 抗体和强的松的治疗相对于仅用强的松的治疗更有效地增加肌肉量和强度。本发明还部分基于如下发现和阐明, 即施用抗 - GDF-8 抗体和强的松减小了强的松诱导的肌萎缩。

因此, 本发明提供了治疗哺乳动物中神经肌肉紊乱的方法。所公开的方法包括对易遭受或者患有神经肌肉紊乱的受试者施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和至少一种皮质类固醇, 以便保持肌肉完整性或者功能的所希望的水平, 所述肌肉完整性或者功能的所希望的水平可以通过例如, 肌酸激酶 (CK) 的血清浓度、肌肉组织学、组织成像、日常生活的活动、肌肉强度和/或量来评估。通过本发明的方法治疗的群体包括, 但不限于, 患有或者有危险患有肌肉营养不良

(例如 DMD 或 BMD) 的患者和由于这些或者其他疾病正经历皮质类固醇治疗的受试者。

本发明还提供了治疗肌无力的方法和治疗皮质类固醇诱导的肌萎缩的方法。本发明包括治疗心肌病的方法。

提供了用于本发明方法的施用方法和组合物。在所公开的方法中, GDF-8 抑制剂和皮质类固醇同时或者在交替重叠或者非重叠的间隔内施用。

用于本发明方法的 GDF-8 抑制剂包括, 但不限于, 针对 GDF-8 的抗体; 针对 GDF-8 受体的抗体; 可溶性 GDF-8 受体和其片段(例如, 如美国专利申请号 10/689,677 中描述的 ActRIIB 融合多肽, 包括其中 ActRIIB 连接免疫球蛋白的 Fc 部分的可溶性 ActRIIB 受体); GDF-8 前肽和其修饰形式(例如, WO 02/068650 或者美国专利申请号 10/071,499 中描述的, 包括其中 GDF-8 前肽连接免疫球蛋白的 Fc 部分的形式和/或其中 GDF-8 在天冬氨酸(asp)残基突变的形式, 例如, 鼠 GDF-8 前肽中的 asp-99 和人 GDF-8 前肽中的 asp-100); GDF-8 的小分子抑制剂; 卵泡抑素(follistatin)(例如, 美国专利号 6,004,937 中描述)或者含有卵泡抑素结构域的蛋白质(例如, 美国专利申请号 10/369,736 和 10/369,738 中描述的 GASP-1 或者其他蛋白质); 和影响 GDF-8 活化的金属蛋白酶活性的调节剂, 如美国专利申请号 10/662,438 中描述的。

在一些实施方案中, GDF-8 抑制剂是阻断 GDF-8 结合其受体的单克隆抗体或者其片段。非限制的阐明性实施方案包括非人单克隆抗-GDF-8 抗体, 例如, 鼠单克隆抗体 JA-16(如美国专利申请号 10/253,532 中描述的; ATCC 保藏号 PTA-4236); 其衍生物, 例如, 人源化抗体; 和完全人单克隆抗-GDF-8 抗体(例如, 如美国专利申请号 10/688,925 中描述的 Myo29、Myo28 和 Myo22; ATCC 保藏号分别为 PTA-4741、PTA-4740 和 PTA-4739)或者其衍生物。

用于本发明方法的皮质类固醇包括, 但不限于, 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的松、曲安奈德和它们的衍生物。

可以理解前面的一般描述和下面的详细描述都仅是示例性和解释性的并且不限制要求保护的本发明。

附图简述

图 1A 和 1B 描绘从用抗 - GDF-8 中和抗体 JA-16 (60 mg/kg, 每周一次) 和强的松 (2 mg/kg, 每周 3 次)、仅强的松或仅载体对照治疗 4 周的 *mdx* 小鼠的隔肌的组织学分析结果。图 1A 显示了试验结束时 0-4 等级的肌纤维萎缩的严重性。图 1B 显示了试验结束时受影响的 (萎缩的) 肌纤维的百分数。每个条形代表一只小鼠。

发明详述

I. 定义

为了更容易理解本发明, 首先定义某些术语。在发明详述全文中给出了额外的定义。

文中所用术语“抗体”指免疫球蛋白或者其部分, 并且包括包含抗原结合部位的任意多肽, 而不管来源、产生方法和其他特征如何。作为非限制性实例, 术语“抗体”包括人、猩猩、小鼠、大鼠、山羊、绵羊和鸡抗体。所述术语包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、非特异抗体、人源化抗体、单链抗体、嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、杂合抗体、突变抗体和 CDR-移植抗体。对于本发明的目的, 除非另外说明, 所述术语还包括抗体片段, 如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和保留抗原结合功能的其他抗体片段。

可以例如, 通过传统的杂交瘤技术 (Kohler 和 Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499)、重组 DNA 方法 (美国专利号 4,816,567) 或者使用抗体文库的噬菌体展示技术 (Clackson 等人 (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks 等人 (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597) 制备抗体。对于多种其他抗体产生技术, 见 *Antibodies: A Laboratory Manual*, 编者 Harlow 等人, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。

术语“抗原结合结构域”指抗体分子的部分, 其包含特异结合抗原的部分或全部或者与抗原的部分或全部互补的区域。当抗原很大时, 抗体可以仅结合抗原的特定部分。表位或者抗原决定簇是抗原分子的一部分, 其负责与抗体的抗原结合结构域的特异相互作用。通过一个或多个抗体可变结构域可以提供抗原结合结构域 (例如, 由 VH 结构域组成的所称作的 Fd 抗体片段)。抗原结合结构域包含抗体轻链

可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

术语“抗-GDF-8 抗体”或者“针对 GDF-8 的抗体”指特异结合 GDF-8 的至少一个表位的任意抗体。术语“GDF-8 受体抗体”和“针对 GDF-8 受体的抗体”指特异结合 GDF-8 受体, 如 ActRIIB 的至少一个表位的任意抗体。术语“中和抗体”指抗体, 其是 GDF-8 抑制剂。

术语“特异相互作用”或者“特异结合”等等指两个分子形成复合物, 其在生理条件下是相对稳定的。该术语还可应用于例如抗原结合结构域对特定表位特异时, 所述表位可以存在于许多抗原上。特异结合的特征是高亲和性和低到中等能力。非特异结合通常具有低亲和性, 具有中等到高能力。通常, 当亲和性常数 K_d 高于 $10^6 M^{-1}$, 高于 $10^7 M^{-1}$, 或优选高于 $10^8 M^{-1}$ 时, 认为结合是特异的。如果必要, 通过改变结合条件可以减小非特异结合而基本上不影响特异结合。此类条件是本领域已知的, 并且技术人员使用常规技术可以选择适宜的条件。通常根据抗体的浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合的时间、不相关分子 (例如, 血清清蛋白、乳酪蛋白) 的浓度等限定条件。

术语“肌肉功能”指肌肉执行生理功能的能力, 所述生理功能如收缩, 其可以通过颤搐或者强直收缩期间产生的力的量来测量。用于评估肌肉功能的其他方法是本领域公知的, 并且包括, 但不限于, 测量肌肉量、抓握力量、血清 CK 水平、日常生活的活动、运动或者强度试验、组织组织学 (例如, E&A 染色, 或者胶原 III 染色), 或者组织成像。评估肌肉功能的非限制性阐明性方法在实施例给出。

术语“GDF-8”指特异生长和分化因子-8, 适宜时指结构上或者功能上与 GDF-8 相关的因子, 例如 BMP-11 和属于 TGF- β 超家族的其他因子。该术语指 GDF-8 的全长未加工的前体形式以及翻译后切割导致的成熟的和前肽形式。该术语还指 GDF-8 的任意片段和变体, 其保持与如本文讨论的成熟 GDF-8 相关的至少某些生物学活性, 包括已经修饰的序列。本发明涉及来自所有脊椎动物物种的 GDF-8, 包括, 但不限于人、牛、鸡、小鼠、大鼠、猪、绵羊、火鸡、狒狒和鱼 (序列信息见例如, McPherron 等人 (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 94: 12457-12461)。

术语“成熟 GDF-8”指从 GDF-8 前体蛋白质的羧基末端结构域

切割的蛋白质。成熟 GDF-8 可以作为单体、同型二聚体或者以 GDF-8 潜在复合体存在。取决于条件，成熟 GDF-8 可以在任意或者所有这些不同形式之间建立平衡。在其生物学活性形式中，成熟 GDF-8 也称作“活性 GDF-8”。

术语“GDF-8 前肽”指从 GDF-8 前体蛋白质的氨基末端结构域切割的多肽。GDF-8 前肽能够结合成熟 GDF-8 上的前肽结合结构域。

术语“GDF-8 潜在复合体”指成熟 GDF-8 同型二聚体和 GDF-8 前肽之间形成的蛋白质复合体。认为两个 GDF-8 前肽结合同型二聚体中两分子成熟 GDF-8 形成无活性的四聚体复合体。潜在复合体可以包括代替或者除了一个或多个 GDF-8 前肽以外的其他 GDF 抑制剂。

术语“GDF-8 活性”指与活性 GDF-8 蛋白质相关的一种或多种生理学生长调节或者形态发生活性。例如，活性 GDF-8 是骨骼肌量的负调节剂。活性 GDF-8 还可以调节肌肉特异酶（例如，肌酸激酶）的产生，刺激成肌细胞增殖，和调节前脂肪细胞（preadipocyte）分化成脂肪细胞。测量体内和体外 GDF-8 活性的示例性方法见例如，美国专利申请号 10/688,925。

文中所用的“GDF-8 抑制剂”通常指下调 GDF-8 活性的任意化合物，并且包括能够抑制 GDF-8 的活性、表达、加工或分泌的任意试剂。GDF-8 抑制剂可以例如，影响前体分子的稳定性或者向活性成熟形式的转化；干扰 GDF-8 与一种或多种受体的结合；或者干扰 GDF-8 受体 ActRIIB 的胞内信号传导。此类抑制剂包括特异抑制 GDF-8 的蛋白质、抗体、肽、肽模拟物（peptidomimetics）、核酶、反义寡核苷酸、双链 RNA 和其他小分子。可以说这样的抑制剂“抑制”、“中和”或者“减小”GDF-8 的生物学活性。

术语“中和”、“中和性”、“抑制性”和它们的同源词指相对于不存在 GDF-8 抑制剂时 GDF-8 的活性，GDF-8 抑制剂导致 GDF-8 活性的减小。活性的减小优选为至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。评估 GDF-8 抑制剂的中和或者抑制性生物学活性的方法是本领域已知的，并且可以例如，使用 ActRIIB 测定法（见，例如，Whittemore 等人（2003）BBRC, 300: 965-97; 或美国专利申请号 10/253,532 中描述的）和 RGA 测定法（如 Thies

(2001) Growth Factors, 18: 251-259 或美国专利申请号 10/253,532 中描述的)来进行。

术语“治疗有效剂量”或者“治疗有效量”指导致患者中症状的预防、发生所述症状的危险降低或者减轻所述症状，或者导致所希望的生物学结果，例如，改善的肌肉功能、临床症状发作延迟等等的化合物的量。可以如随后章节中描述的测定有效量。

术语“治疗”、“治疗方法”和它们的同源词指治疗或预防/预防性措施。需要治疗的那些个体可以包括已经患有特定医学紊乱的个体以及可能最终患该紊乱的那些个体。治疗包括本申请中描述的紊乱的任意症状的任意减轻。除了减少或者减轻症状外，治疗还包括当预期恶化时保持患者的当前状态，或者预防个体中症状的出现，在所述个体中预期症状、紊乱或者疾病发作。治疗可以包括从正常水平降低或者减少一种或多种生理功能。治疗还可以包括与状况、紊乱或者疾病的预计的症状或者预计的进展相比的减小。

II. 用于本发明方法的成分

在本发明的方法中，一种或多种 GDF-8 抑制剂与一种或多种皮质类固醇联合使用。

A. GDF-8 抑制剂

用于本发明方法的 GDF-8 抑制剂包括，但不限于，针对 GDF-8 的抗体；针对 GDF-8 受体的抗体；可溶性 GDF-8 受体和其片段（例如，如美国专利申请号 10/689,677 中描述的 ActRIIB 融合多肽，包括其中 ActRIIB 连接免疫球蛋白的 Fc 部分的可溶性 ActRIIB 受体）；GDF-8 前肽和其修饰形式（例如，WO 02/068650 或者美国专利申请号 10/071,499 中描述的，包括其中 GDF-8 前肽连接免疫球蛋白的 Fc 部分的形式和/或其中 GDF-8 在天冬氨酸（asp）残基突变的形式，例如，鼠 GDF-8 前肽中的 asp-99 和人 GDF-8 前肽中的 asp-100）；卵泡抑素（例如，美国专利号 6,004,937 中描述）或者含有卵泡抑素结构域的蛋白质（例如，美国专利申请号 10/369,736 和 10/369,738 中描述的 GASP-1 或者其他蛋白质）；和影响 GDF-8 活化的金属蛋白酶活性的调节剂，如美国专利申请号 10/662,438 中描述的。

在一些实施方案中，GDF-8 抑制剂是阻断 GDF-8 结合其受体的单克隆抗体或者其片段。非限制的阐明性实施方案包括非人单克隆抗-

GDF-8 抗体, 例如, 鼠单克隆抗体 JA-16 (如美国专利申请号 10/253, 532 中描述的; ATCC 保藏号 PTA-4236); 其衍生物, 例如, 人源化抗体; 和完全人单克隆抗 - GDF-8 抗体 (例如, 如美国专利申请号 10/688,925 中描述的 Myo29、Myo28 和 Myo22; ATCC 保藏号分别为 PTA-4741、PTA-4740 和 PTA-4739) 或者其衍生物。

在一些实施方案中, GDF-8 抑制剂通过结合 GDF-8 或者 GDF-8 受体来阻断 GDF-8 结合其受体。在多种实施方案中, GDF-8 抑制剂是抗 - GDF-8 抗体, 其具有对 GDF-8 的亲和力, 该亲和力表达为亲和性常数 (K_a), 其中 K_a 为至少 $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 或 $10^{12} M^{-1}$ 。还预计用于人中的是作为任意脊椎动物物种的非人抗体的人源化形式和衍生物的抑制剂, 如在本文引用的专利申请或者 Antibody Engineering, 编者 Borrebaeck, 第二版, Oxford University Press, 1995; 和 Antibodies: A Laboratory Manual, 编者 Harlow 等人, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 中描述的。

B. 皮质类固醇

用于本发明方法的皮质类固醇包括, 但不限于倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、强的松、糠酸毛他松、曲安奈德和它们的衍生物。

还可以使用本文公开的化合物的药学上可接受的盐。

通过商业途径可以以多种药物制剂得到皮质类固醇 (Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 第 57 版, Medical Economics Company, 2002)。例如, 可以通过商业途径得到可的松、氢化可的松 (Cortef[®])、强的松 (Deltasone[®]、Meticorten[®]、Orasone[®])、强的松龙 (Delta-Cortef[®]、Pediapred[®]、Prelone[®])、去炎松 (Aristocort[®]、Kenacort[®])、甲基强的松龙 (Medrol[®])、地塞米松 (Decadron[®]、Dexone[®]、Hexadrol[®])、倍他米松 (Celestone[®]) 和去氟可特 (Calcort[®]) 的经口制剂。这些和其他皮质类固醇的其他制剂可以用于本发明的方法中。

C. 治疗和预防方法

本发明提供了治疗哺乳动物受试者的方法, 包括治疗肌肉功能丧失、肌无力和/或皮质类固醇诱导的肌萎缩的方法。

本发明的方法包括对哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇, 其用量和施用时间段足

够治疗至少一种肌肉功能丧失、肌肉量、肌无力、肌萎缩或者心肌病。所述方法可以用于治疗神经肌肉紊乱，如肌营养不良。在一些实施方案中，相对于不存在 GDF-8 抑制剂或者皮质类固醇时的相同治疗，肌肉功能得到改善。所治疗的肌肉包括，但不限于，腓肠肌、胫骨肌、前肌、四头肌、指伸肌、心肌或者隔肌。

神经肌肉疾病包括，但不限于，损害肌肉功能、导致肌肉损伤或者导致肌肉量和/或功能减小的任意急性或慢性疾病或紊乱。多种疾病或紊乱是已知的并且包括，例如，肌营养不良，如杜兴肌营养不良、贝克尔肌营养不良、埃-德肌营养不良、肢带肌营养不良、强直性脊柱综合征、Ullrich 综合征、Fukuyama 肌营养不良、Walker-Warburg 综合征、肌-眼-脑病、面肩胛肱骨肌营养不良、先天性肌营养不良、强直性肌营养不良（Steinert 氏病）、非营养不良性肌强直、周期性麻痹脊髓性肌萎缩、家族性肌萎缩性侧索硬化症、遗传性运动和感觉神经病、Charcot-Marie-Tooth 病、慢性炎性神经病、远端肌病、肌管性/中央核性肌病、线状体肌病、小核病（mini core disease）、中央轴空病、desminopathy、包涵体肌炎、线粒体肌病、先天性肌无力综合征、脊髓灰质炎后肌肉功能障碍和 Emery (2002) *The Lancet*, 359: 687-695; 和 Khurana 等人 (2003) *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2: 379-386 中描述的病症。患者可以表现出轻微、中等或者严重的肌无力、肌肉消瘦和对与这种紊乱相关的独立走动的影响。患有或者有危险患有这些紊乱的患者将从 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇受益。

通常，将从 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的共同施用受益的患者将是显示出血清 CK 活性 2-10 倍或以上的增加、阳性家族史、肌纤维直径的异常变异、肌营养不良蛋白缺陷或者肌营养不良蛋白基因的突变、肌肉量丧失、肌无力、心肌病和/或肌强度丧失的患者。在 *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders*, 编者 Emery, 第二版, Royal Society of Medicine Press, 1997 中描述了诊断方法，包括适宜的遗传试验。组合治疗对于经历不同于神经肌肉紊乱的紊乱的皮质类固醇治疗的受试者和/或有太长的皮质类固醇使用史从而这些受试者表现出或者有危险减小肌肉功能，如特征是肌无力、肌肉量丧失和/或肌萎缩等等的受试者也是有益的。通常使用皮质类固醇治疗的紊乱的实例包括，但不限于，哮喘、变态反应、关节炎、皮肤紊乱（例如，

炎性皮肤病、湿疹、牛皮癣等等)、红斑狼疮和其他慢性炎性状况。

提供了用于本发明方法的施用方法和组合物。施用不限于任何具体递送系统,并且可以包括但不限于,肠胃外(包括皮下、静脉内、髓内、关节内、肌内或者腹膜内注射)、直肠、局部、经皮或者经口(例如,在胶囊、悬浮液或者片剂内)。可以以单剂或者以重复施用,和以多种生理上可接受的盐形式的任一种,和/或使用可接受的药物载体和/或添加剂作为药物组合物的部分对个体施用。生理上可接受的盐形式和标准药物制剂技术和赋形剂是本领域技术人员熟知的(例如, Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 第 57 版, Medical Economics Company, 2002; 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 编者 Gennado 等人, 第 20 版, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000 中描述的)。

将 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇同时或者连续地在重叠或非重叠间隔内施用。在顺序施用中,可以以任意顺序施用 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇。在一些实施方案中,重叠或非重叠间隔的长度多于 2、4、6、12、24 或 48 周。

对于皮质类固醇,处方医生常规地选择剂量和方案。例如,强的松以约 0.1-2 mg/kg 体重/天,最通常 0.5-1 mg/kg/天,例如,0.75mg/kg/天使用。皮质类固醇可以以平均每周一次剂量约 1-14 mg/kg 体重施用,包括约 1、2、5、7、10、12 或 15mg/kg 体重/周,且处方医生可以选择适宜的施用频率。可以选择单剂、连续或者定期的皮质类固醇施用,包括每小时一次、每天一次、每周两次、每周一次或者其他定期间隔。优选地,每天经口或者注射 1-4 次施用皮质类固醇。皮质类固醇剂量可以被最优化为联合治疗,并且可以降低剂量以减小施用的严重副作用。

GDF-8 抑制剂可以单独或者以与皮质类固醇或者另一种化合物的混合物施用。GDF-8 抑制剂可以以约 1 μ g/kg 到 25 mg/kg 的剂量施用,这取决于生理学、症状的严重性和疾病的发展。可以选择单剂、连续或者定期施用,所选的 GDF-8 抑制剂剂次之间的间隔可以为每小时一次、每天一次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次或者其他适宜的间隔。例如,可以通过静脉内(IV)输注、腹膜内或者皮下注射以每周施用一次在门诊患者背景中以约 0.1-10mg/kg 剂量施

用 GDF-8 抑制剂, 如抗体。通常, 由治疗临床医生选择 GDF-8 抑制剂的适宜的治疗有效剂量, 并且所述有效剂量可以为约 $1 \mu\text{g/kg}$ 到 20mg/kg , $1 \mu\text{g/kg}$ 到 10mg/kg , $1 \mu\text{g/kg}$ 到 1mg/kg , $10 \mu\text{g/kg}$ 到 1mg/kg , $10 \mu\text{g/kg}$ 到 $100 \mu\text{g/kg}$, $100 \mu\text{g}$ 到 1mg/kg , 以及 $500 \mu\text{g/kg}$ 到 5mg/kg 。GDF-8 抑制剂的示例性有效剂量包括约 0.1、0.3、0.5、1、5、10 或者 20mg/kg/周 。此外, 可以使用实施例或者 Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 第 57 版, Medical Economics Company, 2002 中指出的特定剂量。

D. 测试化合物的治疗功效的方法

本发明还提供了在动物, 例如啮齿动物或者灵长类动物中测试治疗化合物当与至少一种 GDF-8 抑制剂和至少一种皮质类固醇联合使用时是否有效的方法。在一些实施方案中, 评估化合物的功效的方法包括: 对第一个动物联合施用所述化合物与 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇; 对第二个动物施用 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇; 施用后测定第一和第二个动物中肌肉功能水平; 和比较肌肉功能水平。如果第一个动物中水平低于第二个动物中水平, 那么表明所述化合物或者联合是有效的。

在其他实施方案中, 当化合物与 GDF-8 抑制剂和/或皮质类固醇联合使用时, 可以评估所述化合物治疗肌营养不良的功效。

一些动物模型可以用于此类评估目的。例如, Torres 等人 (1987) Brain, 110: 269-299, 和 Hoffman 等人 (1987) Science, 238: 347-350 已经描述的 *mdx* 模型。在由于肌纤维膜损伤导致的 *mdx* 小鼠和 DMD 人中总是注意到 CK 的极高水平和肌营养不良蛋白的缺陷 (Bulfield 等人 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1189-1192; 和 Matsuda 等人 (1995) J. Biochem. (Tokyo), 118: 959-64)。作为另一实例, 可以使用两种其他动物模型: *utr-/-mdx* 小鼠 (Gillis (2002) Neuromuscul. Disord., 12 (1): 90-84; 和 Deconick 等人 (1997) Cell, 90: 729-738) 和 *nu-/-mdx* 小鼠 (Morrison 等人 (2000) Lab. Invest., 80: 881-891)。

实施例

实施例 1: GDF-8 中和抗体对营养不良肌肉的作用

在 DMD 的 *mdx* 小鼠模型中试验了 GDF-8 的体内抑制可以改善肌营养不良的能力。对 5 到 7 周龄雄性 C57BL/10ScSn-*mdx*/j 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 以每周一次腹膜内注射 GDF-8 中和性鼠抗体 JA-16 (60 mg/kg, 第一周两倍给药, n=11) 和仅载体 (对照组, n=10) 治疗 12 周。还将这些小鼠与没有肌营养不良蛋白缺陷的相同背景品种 (C57BL/10, n=12) 的小鼠进行比较。

在治疗之前、期间和之后监控体重。治疗组中的小鼠相对于载体对照组中的小鼠增重。结果在表 1 中显示。

表 1. 总体重 (g) 平均值与 SEM

试验周	JA-16 (<i>mdx</i>)	载体对照 (<i>mdx</i>)	载体对照 (非 - <i>mdx</i>)
0	21.92 $\pm$ 0.42	22.51 $\pm$ 0.36	19.18 $\pm$ 0.40
4	27.82 $\pm$ 0.43	26.76 $\pm$ 0.60	24.14 $\pm$ 0.27
8	29.59 $\pm$ 0.54	28.49 $\pm$ 0.58	25.31 $\pm$ 0.28
12	32.42 $\pm$ 0.57	31.12 $\pm$ 0.73	27.17 $\pm$ 0.39

给药 6 和 10 周后还将小鼠进行抓握试验。在 4 和 10 周时治疗组中的小鼠分别比载体对照组中的小鼠具有高 9% ($p=0.09$) 和 19% ($p<0.05$) 的抓握力量。结果在表 2 中显示。

表 2. 抓握力量 (lb) 平均值与 SEM

试验周	JA-16 (<i>mdx</i>)	载体对照 (<i>mdx</i>)	载体对照 (非 - <i>mdx</i>)
6	0.261 $\pm$ 0.011	0.239 $\pm$ 0.006	0.239 $\pm$ 0.011
10	0.249 $\pm$ 0.006	0.210 $\pm$ 0.014	0.247 $\pm$ 0.010

为了定量治疗和载体对照之间肌肉量的差异, 将动物处死并解剖四头肌和腓肠肌并称重。治疗组动物的四头肌重量比对照大 13% (0.371 ± 0.009 对 0.317 ± 0.008 g; $p<0.05$)。治疗组动物的腓肠肌重量比对照大 17% (0.223 ± 0.008 对 0.197 ± 0.005 g; $p<0.0005$)。

实施例 2: GDF-8 中和性抗体和强的松对正常和营养不良肌肉的作用

雄性 C57BL/10ScSn-*mdx*/j 和 C57BL/10 (Jackson Laboratory,

Bar Harbor, ME)。在 5-7 周龄开始注射小鼠单克隆抗 - GDF-8 抗体 JA-16、强的松 (P-9901, Sigma) 或者载体 (花生油) 4 周。以 60 mg/kg/周的剂量用 JA-16 腹膜内 (IP) 注射小鼠 (第一周双倍给药) 或者用强的松以 2 mg/kg, 每周 3 次皮下 (SC) 注射。

在治疗之前、期间和之后监控体重和抓握力量。结果分别在表 3 和表 4 中显示。

表 3 总体重 (平均值 $\pm$ SEM, g)

试验周	强的松+JA-16 (<i>mdx</i>)	强的松 (<i>mdx</i>)	载体对照 (<i>mdx</i>)	载体对照 (非- <i>mdx</i>)
0	17.7 $\pm$ 1.6	17.6 $\pm$ 1.8	16.0 $\pm$ 1.9	19.2 $\pm$ 0.4
1	22.1 $\pm$ 1.4	20.9 $\pm$ 1.8	19.1 $\pm$ 2.1	22.4 $\pm$ 0.3
2	25.9 $\pm$ 1.2	24.2 $\pm$ 1.6	23.7 $\pm$ 1.4	23.8 $\pm$ 0.4
3	26.5 $\pm$ 1.1	24.7 $\pm$ 1.5	24.8 $\pm$ 1.2	24.9 $\pm$ 0.4
4	28.1 $\pm$ 1.2	25.9 $\pm$ 1.6	25.7 $\pm$ 1.4	25.6 $\pm$ 0.5

表 4. 抓握力量 (平均值 $\pm$ SEM, lb)

试验周	强的松+JA-16 (<i>mdx</i>)	强的松 (<i>mdx</i>)	载体对照 (<i>mdx</i>)	载体对照 (非- <i>mdx</i>)
0	0.161 $\pm$ 0.018	0.144 $\pm$ 0.010	0.164 $\pm$ 0.014	0.164 $\pm$ 0.009
3	0.219 $\pm$ 0.019	0.177 $\pm$ 0.006	0.168 $\pm$ 0.005	0.212 $\pm$ 0.010
4	0.281 $\pm$ 0.011	0.213 $\pm$ 0.011	0.217 $\pm$ 0.010	0.234 $\pm$ 0.018

在研究结束时, 将小鼠处死并通过解剖和称重腓肠肌和四头肌来估计肌肉量。结果在表 5 中显示。为了证实强的松的生物学活性, 收集来自小鼠的单独群组的血清并分析 IL6 和 IL1 β (Ani Lytics, Inc., Gaithersburg, MD)。发现在用强的松治疗的小鼠的血清中两种细胞因子都减少。

表 5. 肌肉重量 (平均值 $\pm$ SEM, g)

试验周	强的松+JA-16 (<i>mdx</i>)	强的松 (<i>mdx</i>)	载体对照 (<i>mdx</i>)	载体对照 (非- <i>mdx</i>)
腓肠肌	0.364 $\pm$ 0.019	0.287 $\pm$ 0.023	0.299 $\pm$ 0.019	0.280 $\pm$ 0.010
四头肌	0.527 $\pm$ 0.030	0.417 $\pm$ 0.029	0.415 $\pm$ 0.030	0.392 $\pm$ 0.010

因此, 结果表明在肌营养不良中, 施用 GDF-8 的抑制剂, 即抗 - GDF-8 抗体和强的松可以相对于仅用强的松或者载体的治疗有效增加肌肉量和强度。

此外, 在这些研究中, JA16 加强的松治疗 (实施例 2) 的效果大于仅用 JA16 治疗的效果 (实施例 1)。四周治疗后与载体相比体重的增加对于 JA16 加上强的松的治疗比仅 JA16 的治疗更显著。用 JA16 加强的松治疗 4 周后抓握力量与载体对照相比的增加比仅用 JA16 治疗 6 或 10 周后的增加更大。用 JA16 加强的松治疗 4 周后相对于载体对照的肌肉量的增加比仅用 JA16 治疗 12 周后的增加更大。

实施例 3: GDF-8 中和性抗体对强的松诱导的肌萎缩的作用

在如实施例 2 中所述治疗的小鼠中, 如实施例 1 中所述通过组织学检查隔肌。通过独立的病理学实验室评估形态学改变, 该实验室不了解治疗组分配。在 0 到 4 的等级上分配严重性等级 (0=无; 1=最小; 2=轻微; 3=中等; 4=显著)。结果在图 1A (严重性得分) 和图 1B (萎缩的肌纤维的百分数)。结果表明施用抗 - GDF-8 抗体和强的松减小强的松诱导的肌萎缩。

实施例 4: 治疗肌营养不良

作为治疗人类中 MD 的实例, 联合强的松或者强的松龙施用 Myo29 抗体。在表 6 中概述了非限制性示例性治疗方案和结果。通过治疗医生可以确定其他治疗方案, 其中皮质类固醇和 GDF-8 抑制剂的剂量范围和施用如上述。

表 6

患者号	治疗方案	治疗目标
患者 1	Myo29 以 10 mg/kg/周通过每周两次注射施用加上强的松以 0.75 mg/kg/天施用两年，或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 2	Myo29 以 0.1 mg/kg/周通过每周一次静脉内（IV）施用加上强的松以 1.0mg/kg/天施用，如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 3	Myo29 以 1 mg/kg/周通过每月一次注射施用加上强的松以 0.50 mg/kg/天施用两年，或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能或者增加保持还没有受损的肌肉组的功能
患者 4	Myo29 以 20 mg/kg/周，以单剂通过静脉内施用加上强的松以 0.75 mg/kg/天施用两年，或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能或者增加保持功能
患者 5	Myo29 以 .1 mg/kg/周，以单剂通过静脉内施用加上强的松以 5 mg/kg/周施用（如果需要）	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 6	Myo29 以 1 mg/kg/周，通过静脉内每周一次施用加上强的松以 2 mg/kg/周施用至少两个月（或如果需要）	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 7	Myo29 以 10 mg/kg/周，以单剂通过皮下注射施用加上强的松以 7mg/kg/周施用至少 6 个月，或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能

患者 8	Myo29 以 20 mg/kg/周通过注射每周一次施用加上强的松以 14 mg/kg/周施用两年, 或者如果需要, 持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 9	Myo29 以 1 mg/kg/周通过每月两次静脉内施用加上强的松以 10 mg/kg/周施用至少 1 个月, 或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能
患者 10	Myo29 以 0.3 mg/kg/周通过每月一次皮下注射施用加上强的松以 0.75 mg/kg/天施用 1 年, 或者如果需要持续治疗	相对于仅强的松的益处保持和/或增加肌肉量、强度和功能或者增加保持还肌肉组的功能

将引用的所有出版物和专利和通过保藏号或者数据库参考号鉴定的序列完整引用作为参考。

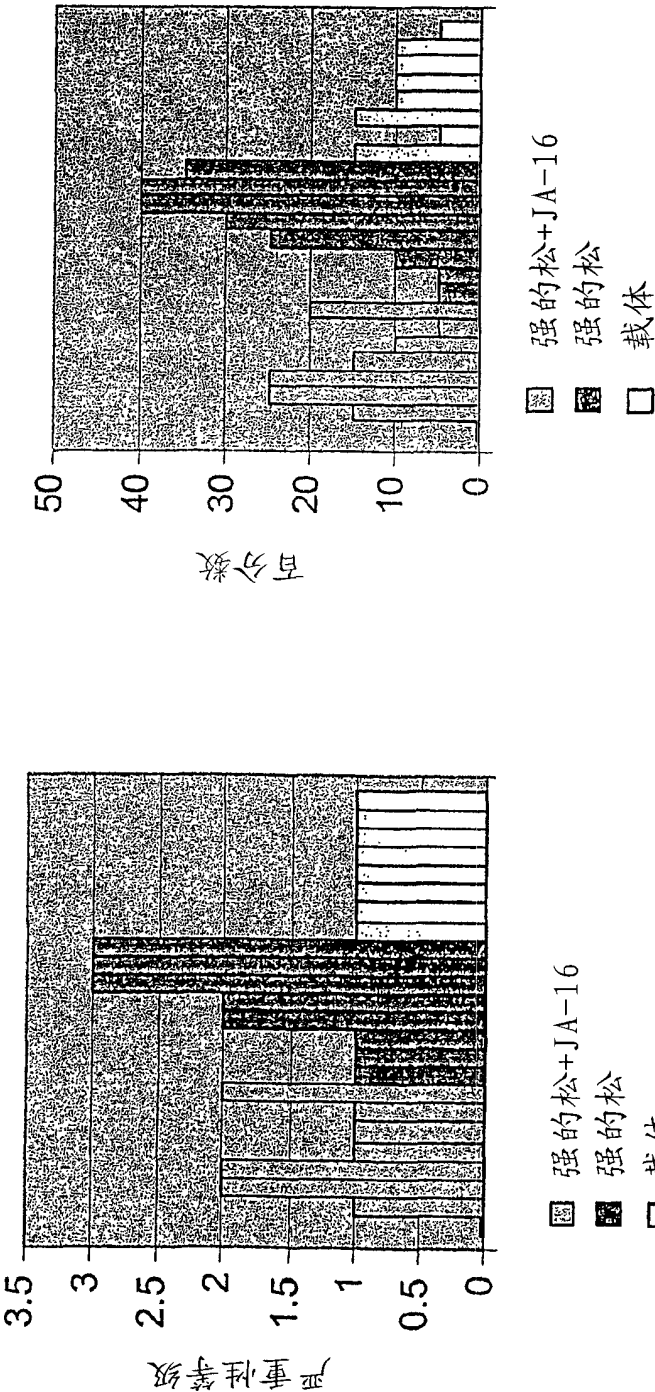


图 1B

图 1A

1. 治疗肌肉功能减弱的哺乳动物的方法，其包含对所述哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗肌肉功能的减弱。

2. 权利要求 1 的方法，其中通过选自肌肉量、肌肉收缩力、血清 CK 浓度或者肌肉形态学的至少一种参数评估至少一种肌肉的肌肉功能。

3. 权利要求 1 的方法，其中治疗其功能的肌肉选自腓肠肌、胫骨前肌、四头肌、指长伸肌、心肌或者隔肌的至少一种。

4. 权利要求 1 的方法，其中治疗所述哺乳动物导致所述哺乳动物的体重增加。

5. 权利要求 1 的方法，其中治疗所述哺乳动物导致抓握力量增加。

6. 治疗肌无力的方法，其包括对哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗肌肉强度的丧失。

7. 治疗皮质类固醇诱导的肌萎缩的方法，其包括对哺乳动物施用足以治疗皮质类固醇诱导的肌萎缩的治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂。

8. 治疗神经肌肉紊乱的方法，其包括对患有或者有危险患有神经肌肉紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的至少一种 GDF-8 抑制剂和治疗有效量的至少一种皮质类固醇，其用量和施用时间段足以治疗所述神经肌肉紊乱。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述神经肌肉紊乱是肌营养不良。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述肌营养不良是杜兴肌营养不良。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述肌营养不良是贝克尔肌营养不良。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述哺乳动物是人。

13. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中所述皮质类固醇选自：(a) 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的松或曲安奈德的至少一种；(b) 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的

松或曲安奈德的至少一种的衍生物; 或(c) 倍氯美松双丙酸酯、布地缩松、氢化可的松、地塞米松、丙酸氟地松、糠酸毛他松、强的松或曲安奈德的至少一种的药学上可接受的盐的至少一种。

14. 权利要求 1-11 任一项的方法, 其中所述皮质类固醇是强的松或者强的松龙。

15. 权利要求 1-11 任一项的方法, 其中所述皮质类固醇以 0.1 到 2.0mg/kg/天的剂量施用。

16. 权利要求 1-11 任一项的方法, 其中经口施用所述皮质类固醇。

17. 权利要求 1-11 任一项的方法, 其中所述 GDF-8 抑制剂选自针对 GDF-8 的抗体、针对 GDF-8 受体的抗体、可溶性 GDF-8 受体、GDF-8 前肽、GDF-8 的小分子抑制剂、卵泡抑素或者含有卵泡抑素结构域的蛋白质。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述针对 GDF-8 的抗体选自 JA-16、Myo29、Myo28 或 Myo22。

19. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 前肽在天冬氨酸残基处突变。

20. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 前肽连接免疫球蛋白的 Fc 部分。

21. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 受体是 ActRIIB。

22. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 受体连接免疫球蛋白的 Fc 部分。

23. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 抑制剂是卵泡抑素。

24. 权利要求 17 的方法, 其中所述含有卵泡抑素结构域的蛋白质是 GASP-1。

25. 权利要求 17 的方法, 其中所述 GDF-8 抑制剂是小分子抑制剂。

26. 权利要求 1 的方法, 其中所述方法导致所述哺乳动物的心脏病的治疗。

27. 权利要求 1 的方法, 其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是同时的。

28. 权利要求 1 的方法, 其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是顺序的。

29. 权利要求 8 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是同时的。

30. 权利要求 8 的方法，其中所述 GDF-8 抑制剂和皮质类固醇的施用是顺序的。