

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 830 440**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2017 PCT/US2017/037332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218592**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2017 E 17732001 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020 EP 3368069**

54 Título: **Uso de inhibidores de miosatina y terapias combinadas**

30 Prioridad:

13.06.2016 US 201662349596 P

10.03.2017 US 201762470157 P

18.04.2017 US 201762486934 P

26.05.2017 US 201762511702 P

30.05.2017 US 201762512254 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LONG, KIMBERLY;
DONOVAN, ADRIANA;
CHYUNG, YUNG y
STRAUB, MICHELLE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 830 440 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

Uso de inhibidores de miostatina y terapias combinadas

5 ANTECEDENTES

10 [0001] La *miostatina*, también conocida como factor de diferenciación de crecimiento 8, GDF-8 abreviado o GDF8, es un regulador clave de la homeostasis muscular. Se ha demostrado que las mutaciones que provocan la pérdida de miostatina, así como la inhibición farmacológica de las actividades de la miostatina, aumentan el crecimiento muscular en varias especies, incluida la humana. Tales validaciones han llevado a numerosos grupos durante los últimos veinte años a desarrollar un antagonista de la vía de la miostatina como terapéutica para tratar afecciones musculares, como atrofia por desuso, sarcopenia y caquexia. Feng et al., (Human Molecular Genetics 25, n° 5 (1 de marzo de 2016): 964-75) describe el uso de la expresión de folistatina mediada por AAV, un inhibidor no selectivo de miostatina, en un modelo farmacológico de atrofia muscular espinal en ratones.

15 [0002] Al menos seis candidatos a fármacos inhibidor de miostatina, incluyendo pequeñas moléculas y biológicos, han entrado en la clínica en los últimos años y han fracasado debido a efectos secundarios no deseados (p. ej., riesgo de toxicidad), la falta de eficacia significativa, o ambos. En muchos casos, los resultados preclínicos satisfactorios no se han traducido con éxito en un fármaco seguro y eficaz, a pesar del hecho de que el papel biológico de la miostatina en la regulación del crecimiento muscular es indiscutible. Falta de éxito traslacional en el desarrollo clínico de inhibidores de miostatina en una serie de afecciones musculares, incluida la distrofia muscular, caquexia, La sarcopenia, la miositis por cuerpos de inclusión esporádica (SIBM) y el desuso, han presentado un enigma en el campo.

25 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención proporciona un inhibidor de miostatina que es selectivo para la miostatina para su uso en un método para tratar la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto, en donde el inhibidor de miostatina selectivo es para ser administrado en una cantidad eficaz para tratar SMA, en donde el sujeto: (i) está en una terapia correctora de SMN o se trata con una terapia correctora de SMN dentro de los seis meses posteriores al inhibidor de miostatina; y (ii) en una fase de crecimiento y/o en necesidad de recibir una terapia a largo plazo, donde opcionalmente la terapia a largo plazo implica el manejo de por vida de la AME, en donde el inhibidor selectivo de miostatina es:

35 (a) un anticuerpo, o su porción de unión a antígeno, que se une a miostatina pro- o latente, inhibiendo así la activación de miostatina; o

(b) un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina madura; y en donde la terapia correctora de SMN comprende:

- 40 i) un modificador de empalme;
ii) un reemplazo del gen SMN o una terapia génica;
iii) un potenciador de la transcripción SMN;
iv) un potenciador de la traducción de proteínas SMN; o,
v) un estabilizador de proteínas SMN.

45 [0004] La invención también proporciona un inhibidor de miostatina que es selectivo para la miostatina, y un corrector de SMN, para uso en un método para el tratamiento de SMA en un sujeto, en donde el sujeto está en una fase de crecimiento y/o en la necesidad de recibir una larga terapia a largo plazo, en la que opcionalmente la terapia a largo plazo implica el manejo de por vida de la SMA, en la que el inhibidor selectivo de la miostatina es:

50 (a) un anticuerpo, o una parte del mismo que se une al antígeno, que se une a la miostatina pro latente, inhibiendo así la activación de la miostatina; o

(b) un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina madura, y en donde el corrector SMN comprende:

- 55 i) un modificador de empalme;
ii) un agente de sustitución del gen SMN o un agente de terapia génica;
iii) un potenciador de la transcripción SMN;
iv) un potenciador de la traducción de proteínas SMN; o,
60 v) un estabilizador de proteínas SMN.

[0005] La presente invención abarca el reconocimiento de que efectos *in vivo* de la inhibición de miostatina dependen del contexto biológico. Según la invención, los factores que confieren la capacidad de respuesta de un músculo diana a una terapia de inhibición de miostatina incluyen i) el estado anabólico de un músculo diana, ii) el grado de inervación funcional por una neurona motora y, opcionalmente, iii) el tipo de fibras musculares contenidas en el músculo diana. Por consiguiente, como se describe con más detalle en el presente documento, estos factores deben tenerse en cuenta

para maximizar o mejorar los beneficios de la inhibición de la miostatina.

[0006] Los inventores de la presente descripción han identificado un conjunto de criterios que pueden proporcionar una guía útil para la determinación de contextos biológicos (p. ej., condiciones clínicas) en donde la inhibición de miostatina puede ejercer efectos óptimos en músculo:

- i) el músculo para ser tratado de promover la hipertrofia ha retenido o recuperado suficiente capacidad anabólica;
- ii) el músculo a tratar para promover la hipertrofia y/o para prevenir la atrofia ha retenido o restaurado al menos una inervación funcional parcial de una neurona motora; y además, en algunos casos,
- iii) el músculo a tratar es necesario para la función motora que se basa en fibras de contracción rápida (p. ej., tipo II).

[0007] El perfil de atributos clínicos adecuados identificados en el presente documento, que pueden determinar la probabilidad de respuesta a la inhibición de la miostatina en el músculo, por lo tanto, proporciona una guía para la selección de indicaciones clínicas adecuadas y para la identificación de poblaciones de pacientes susceptibles de beneficiarse de dicha terapia. En algunos casos, cuando uno o más de los atributos faltan o son insuficientes en un paciente, pueden administrarse uno o más agentes adicionales (p. ej., terapéuticos) para compensar la deficiencia con el fin de mejorar u optimizar la eficacia. Por lo tanto, esta invención engloba las terapias de combinación que incorporan tales agentes junto con un inhibidor de miostatina.

[0008] Por consiguiente, la presente divulgación proporciona varias realizaciones de métodos para tratar una afección muscular en un sujeto. Dichos métodos comprenden el paso de: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de miostatina para mejorar la función muscular/motora, siempre que: i) el músculo diana haya retenido o recuperado capacidades anabólicas intactas, donde el resultado clínico previsto incluye promover la hipertrofia muscular; ii) el músculo diana ha retenido o restaurado al menos la inervación parcial de una neurona motora funcional, cuando el resultado clínico previsto incluye promover la hipertrofia muscular y/o prevenir la atrofia muscular; y/o, iii) el músculo diana afectado en la condición muscular contiene o está enriquecido con fibras de contracción rápida, que son predominantemente fibras de tipo II.

[0009] En algunas realizaciones de la descripción, el sujeto ha conservado capacidades anabólicas (capacidad de crecer) en el músculo de la blanco. Tal sujeto puede ser un paciente pediátrico. En otras realizaciones, el sujeto ha debilitado o comprometido las capacidades anabólicas en el músculo diana, pero ha recuperado suficientes capacidades anabólicas. Las capacidades anabólicas limitadas pueden deberse a la edad, afección médica (lesión, enfermedad, etc), efectos secundarios de un medicamento, estado general de salud o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido tratado con un estimulador anabólico, por ejemplo, un agente que estimula las vías anabólicas celulares. En algunas realizaciones, el sujeto recibe una terapia de combinación que comprende el inhibidor de miostatina y el estimulador anabólico.

[0010] En algunas realizaciones, el sujeto ha conservado en la inervación funcional parcial menos del músculo diana por una neurona motora, por ejemplo, unión neuromuscular funcional. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección asociada con la denervación parcial de las neuronas motoras. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección asociada con una neurotransmisión alterada. En algunas realizaciones, la neurotransmisión alterada comprende hiperexcitabilidad de la neurona, tráfico o liberación alterados de vesículas sinápticas y/o función o disponibilidad alterada de mitocondrias para soportar la señalización neuromuscular. En algunas realizaciones, el sujeto ha restaurado o fortalecido al menos la inervación de la motoneurona funcional parcial del músculo diana, y/o la neurotransmisión al menos parcialmente normalizada entre la motoneurona y el músculo diana. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con un agente que promueve la función de la neurona motora (es decir, terapia neuronal). En algunas realizaciones, dicho agente corrige al menos parcialmente la neurotransmisión y/o la excitabilidad de la membrana. En algunas realizaciones, el agente es un corrector de un defecto genético. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con un agente que corrige el defecto genético, destinado a promover la función de la neurona motora de modo que al menos la inervación o función parcial se pueda mantener o recuperar (restaurar).

[0011] Según la presente invención, el sujeto tiene la atrofia muscular espinal (SMA). En algunas realizaciones, el defecto genético es una mutación en la *neurona motora de supervivencia 1 (SMN1)*. En algunas realizaciones, el agente (p. ej., agente corrector) es un modificador de empalme o una terapia génica. En algunas realizaciones, el modificador de empalme es un agente de molécula pequeña; en otras realizaciones, el modificador de empalme es un agente de ácido nucleico, tal como un agente basado en ARN. En algunas realizaciones, la terapia correctora promueve la función y/o supervivencia de la neurona motora. En algunas realizaciones, la terapia correctora retrasa la progresión de la AME.

[0012] Según la invención, el sujeto ha sido tratado con un agente corrector, y/o va a ser tratado con un agente corrector. Por ejemplo, el sujeto se trata con un agente corrector dentro de los seis meses de la terapia con inhibidor de miostatina, por ejemplo, dentro de los seis meses antes o después de la administración del inhibidor de miostatina. En algunas realizaciones, dicho sujeto tiene o se le ha diagnosticado AME no ambulatorio. En algunas realizaciones, dicho sujeto tiene AME de tipo I, AME de tipo II o AME de tipo III no ambulatorio.

[0013] Según la invención, una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina para tratar una afección muscular es una cantidad que logra tanto la eficacia clínica y la seguridad. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es una cantidad que mejora la función muscular, como la generación de fuerza y la función motora. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva es una cantidad que mejora la función motora que requiere fibras de contracción rápida (p. ej., fibras de tipo II). En algunas realizaciones, la función motora comprende la contracción excéntrica de un músculo. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de la terapia de la miostatina es una cantidad suficiente para retrasar o aliviar la progresión de la enfermedad (p. ej., atrofia muscular); mantener el estado de la enfermedad (p. ej., medido/controlado por una prueba de función motora adecuada, marcadores de proteínas plasmáticas, marcadores metabólicos, etc); retrasar la pérdida de las neuronas motoras α ; prevenir o retrasar la expresión de marcadores musculares inmaduros; prevenir, aliviar o retrasar los depósitos de grasa intramuscular (p. ej., reemplazo graso del tejido muscular); prevenir la desregulación metabólica; prevenir o reducir la pérdida ósea o la frecuencia de fracturas óseas; aumentar la puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith en ≥ 1 punto¹ en comparación con el control que no recibe el inhibidor de miostatina; ralentizar la velocidad de deterioro; regresión del retraso (p. ej. disminución progresiva) de una Escala Ampliada Funcional Hammersmith Motor durante un período de 12, meses, 24 meses o 36 meses; y/o aumentar la puntuación CHOP INTEND en ≥ 1 punto en comparación con el control que no recibe el inhibidor de la miostatina; y/o aumentar una puntuación de MFM-32 en ≥ 1 punto en comparación con el control que no recibe el inhibidor de miostatina.

[0014] La condición muscular a ser tratada con un inhibidor de miostatina según la presente invención es atrofia muscular espinal (SMA).

[0015] Cuando la enfermedad neuromuscular es SMA, el defecto genético puede incluir una mutación en el gen *SMN1*. En el fin de promover la función de la neurona motora afectada por la mutación, el sujeto puede ser tratado con un agente corrector destinado a corregir el defecto genético. En algunas realizaciones, el agente es un modificador de corte y empalme, que puede ser un agente basado en ácido nucleico (p. ej., basado en ARN) o un agente de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con un agente corrector dentro de los seis meses de recibir un inhibidor de miostatina, por ejemplo, dentro de los seis meses antes o seis meses después de la administración del inhibidor de miostatina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0016]

La FIG. 1 proporciona un esquema de la activación de la miostatina. Cada polipéptido precursor del dímero incluye un prodominio y un dominio de factor de crecimiento. El primer paso proteolítico de una proproteína convertida escinde la proMiostatina entre el prodominio y el dominio del factor de crecimiento, produciendo una forma latente de miostatina. De esta forma, el prodominio todavía está asociado físicamente con el dominio del factor de crecimiento. Una proteasa tolloide posteriormente escinde la miostatina latente, después de lo cual se libera miostatina madura activa del complejo latente.

FIG. 2A y FIG. 2B proporciona un resumen de la atrofia inducida por dexametasona en ratones: la FIG. 2A ilustra el modelo experimental de tratamiento de dosis única de SRK-015 en ratones sanos e inducidos por atrofia; FIG. 2B proporciona cambios en los pesos del músculo gastrocnemio medidos en los puntos de tiempo indicados.

FIG. 3A-3E proporciona cinco gráficos que muestran que la administración de muSRK-015P en animales sanos mejora la función muscular. (FIG. 3A) Fuerza máxima generada por el gastrocnemio (normalizada a la longitud de la extremidad) en función de la frecuencia del estímulo en ratones de control y tratados con muSRK-015P; (FIG. 3B) fuerza máxima de la EDL por longitud de músculo en función de la frecuencia del estímulo en ratones de control y tratados con muSRK-015P; (FIG. 3C y FIG. 3D) pesos musculares GA y EDL respectivamente en ratones tratados con muSRK-015P y de control; y (FIG. 3E) área de fibra media de tipo IIB en ratones de control y tratados con muSRK-015P.

FIG. 4 proporciona un gráfico que muestra los efectos de muSRK-015P en fuerza máxima del grupo flexor plantar (gastrocnemio, sóleo y los músculos Plantaris) en ratones $\Delta 7$ SMA tratados con corrector SMN y los ratones de tipo salvaje;

FIG. 5A-5C proporcionan tres gráficos que muestran los efectos de muSRK-015P sobre (Figura 5A) el peso del músculo; (FIG. 5B) significa área en sección transversal de miofibras; y, (FIG. 5C) distribución de frecuencias de área de sección transversal de miofibras, en ratones $\Delta 7$ SMA tratados con un corrector SMN y muSRK-015P o vehículo.

FIG. 6A-6B proporcionan dos gráficos que muestran los efectos de muSRK-015P en (FIG. 6A) masa muscular GA; y (FIG. 6B) fuerza de agarre de las extremidades traseras, en un modelo de lesión de la médula espinal por contusión aguda.

FIG. 7A-7D presentan análisis de compromiso de diana de suero y músculo de ratones SMN $\Delta 7$. La inmunotransferencia para medir la miostatina latente en circulación después de cuatro semanas de tratamiento con muSRK-015P se muestra en la FIG. 7A. La inmunotransferencia de la FIG. 7B muestra el acoplamiento de la diana en el músculo. La FIG. 7C muestra geles sin tinción TGX que permiten la visualización y cuantificación del contenido de proteína de carril total para la normalización en la formación

de imágenes UV. En la FIG. 7D se muestra la cuantificación de la señal de miostatina latente en el músculo de un ratón tratado con muSRK-015P en comparación con la miostatina latente presente en ratones WT.

FIG. 8A-8C proporciona datos de PK y PD para SRK-015 en ratones *scid*. El análisis de PK de SRK-015 se muestra en la FIG. 8A. La masa magra se midió con qNMR en los puntos de tiempo indicados después de la dosificación y en la FIG. 8B se muestra el aumento de la masa magra con respecto al control de IgG. El compromiso de la diana en suero y músculo de SRK-015 se evaluó analizando los niveles de miostatina latente en suero y músculo usando transferencia de Western como se muestra en la FIG. 8C.

FIG. 9A-9B proporciona datos de PK SRK-015 en monos cynomolgus. Las concentraciones de SRK-015 se evaluaron mediante ELISA.

La FIG. 9A muestra las concentraciones de SRK-015 en el suero durante la semana siguiente a la primera dosis de anticuerpo. La FIG. 9B muestra las concentraciones de SRK-015 en el suero durante las últimas cinco semanas del estudio después de la última de las 8 dosis semanales de anticuerpos.

FIG. 10A-10D proporcionan datos que muestran que SRK-015 es farmacológicamente eficaz a múltiples dosis en monos cynomolgus. Los pesos musculares se determinaron cinco semanas después de la última dosis de SRK-015 en monos cynomolgus. La FIG. 10A muestra una masa aumentada en el músculo gastrocnemio después del tratamiento con SRK-015. La FIG. 10B muestra un aumento de masa en los músculos bíceps braquial después del tratamiento con SRK-015. Se analizó el transcurso del tiempo de participación de la diana en el suero de los monos mediante análisis de transferencia de Western semicuantitativo. En la FIG. 10C se muestran los datos de participación del objetivo de monos a los que se les administró 3 mg/kg o 30 mg/kg semanalmente de SRK-015. SRK-015 involucró miostatina latente en ambas dosis ensayadas como se muestra en la FIG. 10D.

FIG. 11A-11B proporcionan datos que muestran el rendimiento muscular en ratones SMNΔ7 tratados con una dosis totalmente terapéutica de SMN-C1 desde el nacimiento. Después de cuatro semanas de tratamiento con muSRK-015P, se midió el aumento de peso corporal con respecto a los animales de control con PBS (FIG. 11A) y el aumento de masa de gastrocnemio (FIG. 11A). El rendimiento de los músculos flexor plantar y masetero se midió usando un sistema de palanca muscular 305C (FIG. 11B).

FIG. 12 es un esquema que ilustra la selección de determinadas poblaciones de pacientes que probablemente se beneficiarán de la inhibición de la miostatina, ya sea sola o en combinación con un agente adicional (p. ej., un estimulador anabólico y/o potenciador neuronal).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES

[0017] La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que la eficacia de la inhibición de la miostatina depende al menos en parte sobre el estado del músculo diana y que ciertas condiciones se deben cumplir para beneficios conferirá función muscular. Según la invención, la inhibición de la miostatina es adecuada particularmente para el tratamiento de indicaciones clínicas con los atributos siguientes: i) el músculo a ser tratado ha conservado o recuperado la capacidad anabólica intacta/robusta (p. ej., sujetos más jóvenes); ii) el músculo que va a tratarse (es decir, músculo diana) ha conservado o recuperado al menos inervación funcional parcial por una neurona motora (p. ej., suficiente señalización neuromuscular entre el músculo diana y una de las neuronas motoras que inervan); y/o, iii) el músculo que se va a tratar es necesario para la función motora que depende de las fibras de tipo II, p. ej., la necesidad médica insatisfecha se satisface potenciando la función de las fibras musculares de contracción rápida (glucolíticas), y la evaluación de un resultado motor está impulsada por la actividad de la fibra de contracción rápida. En base a estos atributos, en el presente documento se describen diversas realizaciones de terapias y terapias de combinación.

[0018] En el contexto de la presente solicitud, el término "terapia de combinación" se refiere a la coadministración de dos o más agentes biológicamente activos (p. ej., fármacos) utilizados en conjunción con la otra. La terapia de combinación puede comprender una sola formulación o múltiples formulaciones. La coadministración puede realizarse como administración concurrente o administración en serie. La coadministración puede realizarse mediante la misma vía de administración o diferentes vías de administración. Se considera una terapia de combinación siempre que los efectos de los dos (o más) agentes terapéuticos se superpongan en el sujeto con el fin de lograr efectos clínicos complementarios, aditivos o sinérgicos.

[0019] El criterio (i) anterior establece que el músculo diana es suficientemente activo porque ha mantenido o restaurado la capacidad de sintetizar componentes celulares (p. ej., metabolismo constructivo (es decir, anabolismo)), en lugar de favorecer la degradación de componentes celulares. Por lo tanto, el músculo con capacidades anabólicas tiene la capacidad de crecer ("hipertrofia") en lugar de consumirse ("atrofia"). Si bien la miostatina se ha validado durante mucho tiempo como un regulador negativo de la masa muscular, de hecho, varios grupos han probado los inhibidores de la miostatina en una variedad de afecciones musculares, pero no lograron generar resultados clínicamente significativos, hasta la fecha estos estudios no han tenido en cuenta la importancia de este fondo "anabólico" contra el cual la inhibición de la miostatina puede ejercer sus efectos sobre la promoción del crecimiento muscular. De hecho, la mayoría de las indicaciones clínicas en las que se han probado los inhibidores de miostatina hasta la fecha involucran poblaciones de pacientes cuyos músculos tienden a estar en estados catabólicos. Junto con la noción de que los factores que regulan la síntesis muscular y la degradación muscular se encuentran en un equilibrio dinámico, los inventores de la presente solicitud reconocieron que la inhibición de la señalización de la miostatina puede producir efectos de mejora muscular, en la medida en que el músculo diana también retiene suficientes

actividades anabólicas, que conducirían la síntesis de proteínas.

[0020] Para satisfacer el criterio (i) anterior, dos escenarios pueden ser considerados. En el primer escenario, este criterio puede naturalmente ser cubierto por los individuos más jóvenes (p. ej., pacientes pediátricos y adultos jóvenes) que están en una fase de crecimiento o con el metabolismo robusto, donde las vías anabólicas celulares ya son robustas y activas. Por tanto, estas poblaciones de pacientes tienen un contexto favorable frente al cual la inhibición de la miostatina produce efectos clínicos y es más probable que respondan a una terapia de inhibición de la miostatina, que puede promover el crecimiento muscular. En el segundo escenario, donde una población de pacientes a ser tratados con un inhibidor de miostatina son típicamente individuos mayores o aquellos que se considera que han perdido al menos parte de la maquinaria anabólica o su función (p. ej., aquellos que padecen sarcopenia, caquexia, inmunodeficiencia, infecciones, etc), la inhibición de la miostatina puede no producir los beneficios deseables debido a la falta de actividades anabólicas suficientes. Sin embargo, tales deficiencias pueden superarse o compensarse mediante la coadministración de un segundo agente destinado a estimular las capacidades anabólicas de los pacientes, lo que puede hacer que el paciente responda mejor a la administración simultánea de un inhibidor de miostatina para promover la hipertrofia muscular. Por tanto, la divulgación incluye terapias de combinación para el tratamiento de una afección muscular en un sujeto en un estado catabólico, en donde la terapia de combinación comprende un inhibidor de miostatina (es decir, un agente que inhibe la activación, actividades y/o señalización de la miostatina) y un estimulador anabólico (es decir, un agente que estimula la función anabólica o favorece la síntesis de proteínas). Estos agentes se administran al sujeto en cantidades eficaces para mejorar el crecimiento muscular (p. ej., La síntesis muscular favor sobre la degradación muscular) y para mejorar correspondiente función motora.

[0021] Como se usa en este documento, el término "estado catabólico" significa que el equilibrio de la síntesis y la descomposición (p. ej., proteína de síntesis y degradación de las proteínas) en un tejido/célula diana hacia la última de tal manera que hay un efecto catabólico neto en la diana. De manera similar, como se usa en este documento, el término "estado anabólico" significa que el equilibrio de síntesis y descomposición (p. ej., síntesis de proteínas y descomposición de proteínas) en un tejido/célula diana se inclina hacia el primero de manera que existe un efecto anabólico neto en la diana. Por tanto, para una población de pacientes en un estado catabólico, las terapias que incorporan tanto un inhibidor de la miostatina como un agente estimulante anabólico pueden lograr mejores beneficios clínicos de la inhibición de la miostatina, en comparación con una monoterapia. Normalmente, el estado del tejido diana (p. ej., músculo) se mide determinando los niveles circulantes de diversas hormonas (p. ej. IGF-1, testosterona) y/o determinando los niveles de síntesis de proteínas musculares. La medición de los niveles de hormonas se puede realizar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, incluidos inmunoensayos competitivos que utilizan muestras de suero, saliva u orina. La medición de la síntesis de proteínas musculares se puede realizar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, incluidas biopsias musculares.

[0022] El reconocimiento de la importancia del criterio (ii) se basa en el hallazgo de que la función del músculo y una neurona motora que inerva el músculo diana (denominada colectivamente "unidad motora") es al menos en parte interdependiente y se requiere un grado de intercomunicación (es decir, señalización bidireccional) entre los dos componentes (es decir, el componente neuronal y el componente muscular) para mantener la función neuromuscular. Se contempla que para la inhibición de miostatina para producir efectos significativos sobre la función del músculo diana, el músculo debe recibir suficiente de entrada del nervio de la neurona motora que inerva (es decir, la presencia de la señalización neuromuscular funcional). Es probable que esto sea relevante para ambos contextos clínicos en los que el resultado primario deseado es promover el crecimiento muscular y prevenir la pérdida muscular. Como se demuestra en el ejemplo siguiente, en múltiples modelos de lesión muscular, la inhibición de la miostatina puede prevenir o mitigar la atrofia muscular inducida por lesión, así como la desregulación metabólica. En estos modelos animales, el músculo lesionado retuvo al menos parcialmente la información nerviosa, en contraposición a una sección completa de los nervios motores que inervan. Los informes anteriores en la literatura indican que la inhibición de la miostatina no mejora la función muscular en un modelo completo de lesión de la médula espinal. Sin desear estar ligado por una teoría particular, se contempla, por lo tanto, que suficiente entrada neuronal (p. ej., neurotransmisión) a partir de la neurona motora que inerva al menos en parte contribuye a los efectos beneficiosos de la inhibición de miostatina en el músculo diana. Normalmente, la neurotransmisión se mide en animales intactos estimulando directamente un nervio (p. ej., un nervio que inerva un músculo) y midiendo las contracciones de los grupos de músculos inervados. En tales mediciones, la falta de contracción muscular indica la ausencia de neurotransmisión. De manera similar, las reducciones incrementales de la respuesta medida en el músculo diana después de la estimulación repetida pueden ser indicativas de "fatiga" que puede reflejar un deterioro en la excitabilidad de la membrana, tráfico de vesículas sinápticas, función/disponibilidad mitocondrial y/o regulación de glucosa. En la SMA hay una pérdida progresiva de las uniones neuromusculares completamente inervadas, que puede evaluarse mediante inmunofluorescencia. Otros métodos electrofisiológicos conocidos para una persona de experiencia en la técnica también pueden ser utilizados medida neurotransmisión (p. ej., la transmisión neuromuscular).

[0023] El requisito de suficiente señalización neuronal significa que los inhibidores de miostatina pueden no producir un beneficio óptimo si la conversación cruzada de nervio-músculo se pierde o se destruye por completo (es decir, ausencia de señalización neuromuscular funcional) ya sea en una lesión o en determinadas situaciones de enfermedad. Esta noción llevó a los presentes inventores a reconocer que, en las enfermedades neuromusculares que implican un defecto genético que daña la motoneurona, el músculo diana *per se* aún puede estar intacto durante la etapa temprana de la enfermedad, pero su función puede disminuir gradualmente debido a la falta de suficiente

5 entrada neuronal de la neurona motora al músculo, así como retroalimentación a la neurona motora del músculo (es decir, la falta de señalización neuromuscular funcional). Por lo tanto, se prevé en el presente documento que una intervención (p. ej., la intervención farmacológica) para promover la señalización de nervio-músculo, que se dirige y corrige o restaura el defecto neuronal subrayando, a continuación, deben mejorar el beneficio de la inhibición de la miostatina.

10 **[0024]** En el presente documento se describen terapias de combinación para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular. Dicha terapia de combinación comprende: i) un inhibidor de la señalización de la miostatina (p. ej., un agente que inhibe la activación, las actividades y/o la señalización de la miostatina) y, ii) una terapia neuronal (p. ej., corrector neuronal, potenciador neuronal, etc), que comprende un agente destinado a tratar la neurona motora para corregir un defecto neuronal (como una mutación genética que causa la enfermedad). El inhibidor de miostatina y el agente para tratar la neurona motora pueden administrarse conjuntamente como terapia de combinación, en cantidades eficaces para mejorar la función motora.

15 **[0025]** Poblaciones de pacientes adecuados para recibir una terapia de inhibición de miostatina para el tratamiento de enfermedad neuromuscular incluyen aquellos que están en una terapia neuronal (p. ej., que han recibido un corrector/potenciador neuronal). Basándose en la noción de que la unidad motora funcional implica una señalización bidireccional entre el músculo diana y la neurona motora que inerva, se contempla que la mejora de la función de una puede afectar positivamente la función de la otra, y viceversa. Por tanto, una subpoblación de pacientes que han recibido pero no responden a una terapia neuronal de una manera clínicamente significativa puede volverse más receptiva a la terapia neuronal junto con una terapia de inhibición de miostatina. De manera similar, una subpoblación de pacientes que responden a una terapia neuronal puede ver beneficios clínicos adicionales al recibir una terapia de inhibición de miostatina.

25 **[0026]** Los métodos descritos en este documento son adecuados para tratar o prevenir afecciones o trastornos musculares y las enfermedades neuromusculares. Como se usa en el presente documento, el término "afección muscular" o "trastorno muscular" se refiere a una enfermedad, afección o trastorno, en donde el músculo no funciona normalmente, o una enfermedad, afección o trastorno, en donde la función del músculo es normal, pero hay menos fuerza generada por el músculo debido a una cantidad reducida de músculo disponible. Como se usa en este documento, el término "enfermedades neuromusculares" se refiere a cualquier enfermedad o que está causada por, o asociada con, una transducción de señal interrumpida o una ruptura en la comunicación entre una neurona y un tejido muscular. En algunas realizaciones de la divulgación, la señalización neurológica deteriorada se produce debido a un daño en la estructura de la neurona, donde las neuronas son incapaces de transmitir señales hacia sus dianas. En otras realizaciones, las estructuras de las neuronas permanecen intactas, pero hay alteraciones o defectos funcionales, por ejemplo, un bloqueo en la unión neuromuscular, de manera que se ve afectada la capacidad de las neuronas para transmitir señales. En algunas realizaciones, la transducción de señal interrumpida está asociada con la denervación, p. ej., una pérdida parcial o una perturbación de la inervación o la entrada neuronal a su músculo diana. En algunas realizaciones, la denervación es inducida por lesión. Las enfermedades o afecciones neuromusculares adecuadas que se pueden tratar de acuerdo con la descripción incluyen, pero no se limitan a: esclerosis lateral amiotrófica (ELA); Síndrome miasténico congénito; miopatía congénita; síndrome de fasciculación de calambres; distrofia muscular de Duchenne (DMD); Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II; paraplejía espástica hereditaria; miositis por cuerpos de inclusión (IBM); Síndrome de Isaac; Síndrome de Kearns-Sayre; Síndrome miasténico de Lambert-Eaton; Miopatía mitocondrial; Distrofia muscular; Miastenia gravis; Distrofia miotónica; Neuropatía periférica; Atrofia muscular espinal y bulbar; Atrofia muscular espinal (SMA); Atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria tipo 1; Síndrome de la persona rígida; Síndrome de Troyer; y síndrome de Guillain-Barré.

50 **[0027]** En cualquiera de las realizaciones anteriores de la descripción, co-administración de un agente destinado a mejorar/promover la función neuronal o corregir/restaurar subrayando defectos neuronales (denominados colectivamente como "terapia neuronal"), y un inhibidor de la miostatina es útil. Además, dicha terapia de combinación puede incluir además un agente estimulante anabólico (es decir, un estimulador anabólico) para pacientes cuyo músculo diana puede estar en estado catabólico o en riesgo de estarlo. Tal estimulador anabólico puede aumentar el beneficio del inhibidor de miostatina, cuando se usa en combinación. Por tanto, la divulgación incluye un método para tratar una enfermedad neuromuscular en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad de terapia de combinación que comprende un inhibidor de miostatina, un potenciador/corrector neuronal (es decir, terapia neuronal) y un estimulador anabólico.

60 **[0028]** El reconocimiento de los factores que pueden afectar el resultado de la terapia de inhibidor de miostatina como se ha descrito anteriormente se ilustra adicionalmente en la FIG. 12.

65 **[0029]** El criterio (iii) captura la noción de que los músculos se ven afectados de forma diferencial por la inhibición de la miostatina basándose en parte en sus tipos de fibras. La evidencia proporcionada en este documento sugiere que los músculos que están enriquecidos con fibras de contracción rápida (tales como fibras de tipo II), incluidas las fibras glucolíticas de contracción rápida, pueden ser particularmente sensibles a la inhibición de la miostatina. Por lo tanto, las terapias de inhibidor de miostatina pueden proporcionar beneficios preferentemente a contracción rápida de músculos ricos en fibra (p. ej., los músculos que contienen fibras de tipo II) y mejorar la función de motor que requiere

o se basa en fibras de contracción rápida. Como se muestra en la FIG. 2, se encontró que el músculo gastrocnemio responde a la terapia de inhibición de miostatina. Cabe señalar que se sabe que el gastrocnemio contiene aproximadamente un 75% de fibras glicolíticas de contracción rápida.

5 **[0030]** En consecuencia, la presente divulgación se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que los pacientes que padecen un trastorno neurológico que deteriora la función motora pueden beneficiarse de una combinación de ambos agentes que se dirigen a la función muscular (como un potenciador muscular) y un agente que se dirige a la función neuronal (que puede denominarse generalmente "terapia neuronal"), como moduladores de empalme y correctores de genes. Esto es particularmente útil para tratar afecciones que implican una señalización alterada entre una neurona motora y su músculo diana (como trastornos neuromusculares). La presente divulgación es particularmente útil en el tratamiento de afecciones que implican la pérdida parcial pero no completa de neuronas que inervan el músculo.

15 **[0031]** La divulgación incluye el reconocimiento de que la inhibición de la señalización de miostatina puede ser ventajosa en el tratamiento de condiciones en las que músculos ricos en fibra altamente metabólicos, de contracción rápida son particularmente vulnerables. En realizaciones particularmente útiles de la divulgación, los regímenes terapéuticos para tratar tales afecciones incluyen un inhibidor o antagonista de la señalización de miostatina, en combinación con un agente que trata la neurona motora que inerva el músculo rico en fibras de contracción rápida.

20 **[0032]** Tales condiciones pueden estar asociadas con una mutación genética que da como resultado el transporte axonal defectuoso o la regulación del mismo; tráfico de vesículas defectuosas o regulación del mismo; neurotransmisión defectuosa o regulación de la misma; función o disponibilidad mitocondrial defectuosa; o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones de la divulgación, tal mutación genérica puede provocar una producción de energía defectuosa, consumo de energía, uso de glucosa o regulación de los mismos.

25 **[0033]** Según la invención, dicha condición es la atrofia muscular espinal (SMA).

Definiciones

30 **[0034]** Los artículos "un" y "una" se usan aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

35 **[0035]** Aparte de en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en el presente documento deben entenderse como modificados en todas las instancias por el término "sobre". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar $\pm 1\%$. Además, el término "aproximadamente" puede significar dentro del $\pm 1\%$ de un valor.

40 **[0036]** Los términos "administrar", "administrado" o "administración" incluyen cualquier método de administración de un inhibidor de miostatina, corrector neuronal, por ejemplo, corrector SMN, y/o estimulador anabólico, por ejemplo, una composición farmacéutica, en un sistema del sujeto o a una región particular en o sobre un sujeto (administración sistémica y local, respectivamente).

45 **[0037]** El término "respondedor" como se usa en el presente documento, se refiere a los pacientes para los que la respuesta predicha a un fármaco de tratamiento/biológico es positivo. De manera similar, el término "paciente que no responde" como se usa en el presente documento, se refiere a pacientes para los cuales la respuesta prevista al tratamiento/fármaco biológico es negativa o está ausente. El término "mala respuesta", como se usa en el presente documento, se refiere a pacientes para los que la respuesta prevista a un tratamiento/fármaco biológico es positiva pero no logra el tratamiento completo de la enfermedad/trastorno y en los que el paciente se beneficiaría de una terapia adicional para lograr respuestas clínicas adicionales y/o mejoradas.

50 **[0038]** El término "respuesta predicha" o similar, como se usa aquí se refiere a la determinación de la probabilidad de que el paciente responderá favorable o desfavorablemente a un fármaco de terapia/biológico dado. Especialmente, el término "predicción", como se usa en este documento, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil para determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la técnica, la predicción de la respuesta clínica al tratamiento con un fármaco biológico, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para que el 100% de los sujetos sean diagnosticados o evaluados. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos pueda identificarse con una mayor probabilidad de tener una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar sin más esfuerzo si un sujeto es estadísticamente significativo utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, p. ej., determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 o 0,05.

65 **[0039]** El término "respuesta clínica", como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta a un fármaco

biológico del sujeto sufrimiento de una patología que es tratable con dicha biológica. Los criterios estándar pueden variar de una enfermedad a otra y se discuten con más detalle en este documento.

5 **[0040]** Un paciente que "beneficiaría de crecimiento muscular" incluye tanto a pacientes sanos como a pacientes que tienen enfermedades y/o trastornos con masa muscular reducida y/o la fuerza muscular. En una realización, un paciente que se beneficiaría del crecimiento muscular es un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno muscular, p. ej., SMA.

10 **[0041]** Tal como se utiliza aquí, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos, y respectivo(s) componente(s) de los mismos, que son esenciales para la invención, sin embargo, abierto(s) a la inclusión de elementos no especificados, si esencial(es) o no.

15 **[0042]** El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no descrito en esa descripción de la realización.

20 **[0043]** El término "control" o "muestra de control", como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra, población, o homólogo comparativo clínicamente o científicamente relevante, incluyendo, por ejemplo, una muestra de un sujeto sano, una muestra de un sujeto que tiene una deficiencia que puede causar o hacer que el sujeto sea susceptible a una determinada enfermedad o condición, un sujeto con una enfermedad o condición de interés, una muestra de un sujeto tratado con un portador farmacéutico, una muestra de un sujeto antes del tratamiento, una simulación o sujeto o muestra tratada con tampón, un sujeto o muestra no tratado y similares.

25 **[0044]** El término "nivel de control" se refiere a un nivel aceptado o predeterminado de un marcador biológico, por ejemplo, un nivel de un marcador obtenido antes del tratamiento o la aparición de la enfermedad o antes de la administración de un fármaco, por ejemplo, un inhibidor de miosatina o un corrector SMN. El nivel de un marcador biológico presente en un sujeto o población de sujetos que tienen una o más características particulares, p. ej., la presencia o ausencia de una enfermedad o afección particular, por ejemplo, SMA.

30 **[0045]** El término "disminución", como se usa en este documento, en el contexto de un síntoma de la enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o por debajo del nivel de detección para el método de detección. La disminución también puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, 10-20%, 1-30%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80% o 60-90% por debajo del nivel de detección para el método de detección. En ciertas realizaciones, la reducción se reduce a un nivel aceptado como dentro del rango de normal para un individuo sin tal trastorno, que también puede denominarse normalización de un nivel.

40 **[0046]** El término "aumento" en el contexto, por ejemplo, de un síntoma de la enfermedad, tal como, por ejemplo, una pérdida de la función o la pérdida de la masa, p. ej., masa muscular asociada a una enfermedad, se refiere a un aumento estadísticamente significativo de dicho nivel. El aumento puede ser, por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o por encima del nivel de detección para el método de detección. El aumento también puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, 10-20%, 1-30%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80% o 60-90% por encima del nivel de detección del método de detección. En determinadas realizaciones, el aumento llega hasta un nivel aceptado como dentro del intervalo normal para un individuo sin tal trastorno, que también puede denominarse normalización de un nivel. En ciertas realizaciones, el aumento es la normalización del nivel de un signo o síntoma de una enfermedad, un aumento en la diferencia entre el nivel de sujeto de un signo de la enfermedad y el nivel normal del signo de la enfermedad.

50 **[0047]** Como se usa en este documento, el término "denervación" se refiere a la pérdida o perturbación del suministro de nervio o de entrada neuronal a su tejido diana, tal como un tejido muscular. La "denervación parcial" puede, por tanto, estar asociada con una señalización neuromuscular parcialmente alterada entre un músculo diana y una neurona motora que inerva. Las causas de la denervación incluyen la enfermedad (p. ej., trastornos genéticos de las neuronas motoras), toxicidad química, lesión física, o la interrupción quirúrgica intencional de un nervio y similares. La denervación puede ser una denervación parcial (también denominada denervación incompleta) o una denervación completa. La denervación parcial puede ser, por ejemplo, al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de pérdida o perturbación de la innervación o entrada neuronal a su tejido diana. En algunas realizaciones, la denervación parcial incluye aproximadamente 1-10%, 10-20%, 1-30%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90% de pérdida o perturbación de la innervación o entrada neuronal a su tejido objetivo. La denervación parcial y el daño neuromuscular se miden usando, por ejemplo, el potencial de acción del músculo compuesto y la estimación del número de unidades motoras, como se describe con más detalle en el presente documento.

65 **[0048]** "Determinación" como se utiliza aquí se entiende como la realización de un ensayo o el uso de un método para determinar el estado de alguien o algo, p. ej., La presencia, ausencia, nivel o grado de una cierta condición, biomarcador, estado de enfermedad o condición fisiológica.

[0049] El "desarrollo" o "progresión" de una enfermedad significa manifestaciones iniciales y/o subsiguiente progresión 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.

[0050] Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o prueba de esta descripción, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. La abreviatura, "p. ej." se deriva del latín *exempli gratia*, y se usa en este documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura "p. ej." es sinónimo del término "por ejemplo".

[0051] Como se usa en este documento, los términos "cantidad eficaz" y "dosis efectiva" se refieren a cualquier cantidad o dosis de un compuesto o composición que es suficiente para cumplir su finalidad prevista, es decir, una respuesta biológica o medicinal deseada en un tejido o sujeto con una relación beneficio/riesgo aceptable. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, el propósito pretendido puede ser inhibir la activación de miostatina *in vivo*, para lograr un resultado clínicamente significativo asociado con la inhibición de miostatina.

[0052] La medida del propósito pretendido relevante puede ser objetiva (es decir, medible mediante algún ensayo o marcador) o subjetiva (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que, cuando se administra a una población de pacientes que cumple ciertos criterios clínicos para una enfermedad, trastorno o afección (p. ej., según lo determinado por los síntomas manifestados, la progresión/etapa de la enfermedad, el perfil genético, etc.), se obtiene una respuesta terapéutica estadísticamente significativa entre la población.

[0053] En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que, cuando se administra de acuerdo con un determinado régimen, produce un resultado clínico positivo con un nivel razonablemente aceptable de efectos adversos (p. ej., toxicidad), tal que los efectos adversos, si están presentes, son lo suficientemente tolerables para que un paciente continúe con el régimen terapéutico, y el beneficio de la terapia supera el riesgo de toxicidad. Los expertos en la técnica apreciarán que en algunas realizaciones de la invención, se puede considerar que una dosis unitaria contiene una cantidad eficaz si contiene una cantidad apropiada para la administración en el contexto de un régimen de dosificación correlacionado con un resultado positivo.

[0054] Normalmente se administra una cantidad terapéuticamente eficaz en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier agente farmacéutico particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. En algunas realizaciones, la cantidad específica terapéuticamente eficaz (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y/o la velocidad de excreción o metabolismo del agente farmacéutico específico empleado; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

[0055] Por "tratar" o "prevenir" una enfermedad o trastorno se entiende retrasar o prevenir la aparición de tal enfermedad o trastorno, invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión, empeoramiento o deterioro, la progresión o la gravedad de una afección asociada con dicha enfermedad o trastorno, pero no necesariamente requiere un tratamiento o prevención completos de la enfermedad o trastorno. En una realización, los síntomas de una enfermedad o trastorno se alivian en al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%.

[0056] Tal como se utiliza aquí, el término "terapia neuronal" se refiere a un agente destinado a mejorar (p. ej., mejorar o restaurar) la función neuronal. Las terapias neuronales son útiles para tratar afecciones que implican una señalización alterada entre una neurona motora y su músculo diana (como trastornos neuromusculares). Específicamente, las terapias neuronales son particularmente útiles en el tratamiento de afecciones que implican pérdida parcial pero no completa de neuronas que inervan el músculo. Según la presente divulgación, una "terapia neuronal" puede ser una terapia génica, una molécula pequeña o un oligonucleótido antisentido, como se describe con más detalle en el presente documento. En una realización, una "terapia neuronal" es un "corrector SMN", como se describe con más detalle en el presente documento. En algunas realizaciones, la terapia neuronal es un agente que es capaz de restaurar completamente la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, una terapia neuronal es un agente que es capaz de restaurar parcialmente la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, una terapia neuronal es un agente que es capaz de restaurar al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más de la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). Un experto en la materia comprenderá que la función de la neurona motora

incluye típicamente la excitabilidad de la membrana, el transporte axonal, el tráfico de vesículas, la liberación de neurotransmisores, la función mitocondrial y/o la disponibilidad mitocondrial, y tales funciones se miden usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica.

5 **Atrofia muscular espinal (SMA)**

10 **[0057]** La atrofia muscular espinal (SMA) es una enfermedad neuromuscular debilitante, frecuentemente fatal y la causa genética más común de mortalidad infantil (1). Es una de las enfermedades raras más comunes - aproximadamente 1 de cada 54 personas son portadores, y 1 en ~11.000 niños nacen con SMA. La SMA es un trastorno genético autosómico recesivo que implica una mutación o delección en el gen Survival Motor Neuron 1 (SMN1). Específicamente, la SMA es causada por reducciones en el nivel de proteína SMN, cantidades suficientes de las cuales son necesarias para promover la supervivencia de las células del asta anterior de la médula espinal. La pérdida de neuronas motoras produce una atrofia muscular profunda, que a menudo conduce a la muerte por insuficiencia respiratoria (2).

15 **[0058]** Mientras que los pacientes de SMA carecen de un gen SMN1 funcional, el gen parálogo, SMN2, produce bajos niveles de proteína SMN funcional debido a corte y empalme alternativo que trunca la transcripción. Los métodos y composiciones adecuadas para tratar pacientes con SMA que son eficaces para prevenir la atrofia muscular y promover la supervivencia neuronal son de gran interés. La SMA es clínicamente heterogénea, y los pacientes se clasifican según la gravedad de su enfermedad.

20 **[0059]** El tipo 0 es la versión más grave de la SMA y se diagnostica prenatalmente con un movimiento fetal reducido en el útero. Los pacientes requieren asistencia respiratoria al nacer. La SMA tipo 1 generalmente se diagnostica entre el nacimiento y los 6 meses, y los pacientes nunca obtienen la fuerza suficiente para sentarse de forma independiente. Sin intervención, la mayoría de los pacientes con diabetes Tipo 1 no sobreviven pasados dos años sin asistencia respiratoria. Las personas con Tipo II y Tipo III producen mayores cantidades de proteína SMN y tienen formas de SMA menos graves, pero aún así, que alteran la vida. Los pacientes de Tipo II se diagnostican entre los seis y los 18 meses de edad. Si bien pueden sentarse sin ayuda, no pueden caminar sin ayuda. Con SMA Tipo III, los pacientes son diagnosticados después de los 18 meses y pueden sentarse y caminar sin ayuda, aunque pueden volverse dependientes de la silla de ruedas más adelante en la vida. La SMA de tipo IV es de inicio en la edad adulta, de fenotipo leve y muy rara (1, 3). Aunque la estratificación de SMA por tipo es un paradigma clínico útil, el fenotipo de la enfermedad existe más como un continuo que como clasificaciones discretas (4).

25 **[0060]** La heterogeneidad clínica de SMA es debido en parte a la genética complicada de la enfermedad. Las mutaciones en el gen SMN1 dan como resultado SMA (5); sin embargo, en los seres humanos, un gen casi idéntico, SMN2, se encuentra muy cerca de SMN1 (6). La principal diferencia entre estos genes es una transición de C a T que crea un silenciador de empalme exónico, lo que resulta en la eliminación del exón 7 de la transcripción de ARNm final. La proteína SMN truncada es inestable y se degrada rápidamente. Sin embargo, aproximadamente el 10% del ARNm producido a partir de SMN2 se empalma correctamente y produce proteína SMN de longitud completa, pero esta cantidad es insuficiente para compensar completamente la pérdida de SMN1. El número de copias de SMN2 varía entre individuos, con más copias (3 a 4) generalmente asociadas con formas más leves de SMA (1-4).

30 **[0061]** Aunque el papel de SMN en la regulación de supervivencia y función neuronal motora no se han elucidado completamente, su mejor función caracterizada es en biogénesis de snRNP y pre-ARNm de empalme (2). Y aunque las neuronas motoras parecen ser particularmente sensibles a las reducciones en los niveles de proteína SMN, SMN se expresa de forma ubicua y otros sistemas de órganos también se ven afectados en pacientes con SMA, incluidos el hígado, el bazo, el sistema gastrointestinal, el sistema nervioso autónomo y los huesos (3). Como se describió anteriormente, la atrofia severa del músculo esquelético se observa en pacientes con SMA y se debe principalmente a la pérdida de la inervación de la neurona motora, aunque los músculos no se ven afectados por igual, y los músculos axiales muestran generalmente una mayor atrofia y denervación que los músculos apendiculares (2, 7). En los pacientes con SMA, el diafragma se conserva en gran medida, debido a la preservación del nervio frénico (8). Curiosamente, las fibras musculares de contracción rápida de tipo II muestran una atrofia significativamente mayor que las fibras de contracción lenta de tipo I (9). El grado de atrofia muscular está directamente relacionado con el grado de inervación, y los músculos inervados por nervios menos afectados por la pérdida de proteína SMN muestran menos atrofia (7, 8, 10). Sin embargo, la proteína SMN parece desempeñar un papel directo en el músculo esquelético, ya que las células miogénicas aisladas de modelos de ratón de SMA muestran una expresión génica miogénica desregulada y se diferencian prematuramente, lo que conduce a una mala formación de miotubos (11, 12). Además, hay evidencia de patología muscular en ratones presintomáticos, y la delección específica del músculo del exón 7 de SMN conduce a distrofia muscular severa (13, 14).

35 **Enfoques terapéuticos para correctores SMA - SMN**

40 **[0062]** Múltiples enfoques terapéuticos para restaurar los niveles de proteína SMN están bajo investigación: terapia de sustitución genética SMN1, las moléculas pequeñas que modulan el empalme de SMN2 y el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO) para bloquear un silenciador de corte y empalme intrónico SMN2, aumentando así la inclusión del exón7.

[0063] La terapia de reemplazo del gen SMN1 utilizando vectores virales adenoasociados (AAV) ha mostrado beneficios en modelos de ratón de SMA y AVXS-101, un vector AAV9-SMN1 de AveXis, se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I (ver NCT02122952)).

[0064] Otros enfoques se centran en la modulación de empalme de SMN2, de tal manera que el exón 7 se retiene en un porcentaje mayor de los transcritos, que conduce a una mayor producción de proteína SMN de longitud completa. Novartis y PTC Therapeutics/Roche han desarrollado moléculas pequeñas que mejoran selectivamente la inclusión del exón 7 de SMN2, lo que da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN de longitud completa y eficacia terapéutica en modelos de ratón de SMA (16-19). Estas pequeñas moléculas de ambas empresas se encuentran actualmente en ensayos clínicos de fase 2 (véanse los ensayos NCT02913482, NCT03032172, NCT02908685, NCT022688552). La dosificación oral de RG7800, SMN-C2 y SMN-C3 en modelos preclínicos leves y graves de SMA mostró que los compuestos aumentaron los niveles de proteína SMN tanto en el tejido cerebral como muscular en ratones tratados, en comparación con el vehículo. Las moléculas también cruzaron eficientemente la barrera hematoencefálica (BBB). En el modelo de ratón con SMA severo, ambos compuestos normalizaron el comportamiento motor y aumentaron el peso y la supervivencia en comparación con el vehículo. Sin embargo, el programa clínico se suspendió debido a problemas de seguridad.

[0065] LMI070, otro modulador de empalme SMN2 de molécula pequeña de fase clínica, también se suspendió después de los resultados de un estudio en animales preclínicos mostraron lesiones en los nervios periféricos y la médula espinal, los testículos y los vasos sanguíneos en el riñón.

[0066] Un medicamento centrado en el músculo, CK-212 107, ahora se dirige a troponina del músculo esquelético para alterar la contractilidad.

[0067] Los correctores de empalme SMN2 basados en moléculas pequeñas adicionales se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense N°: US 2009/0031435, publicada el 29 de enero de 2009; y Patente de los Estados Unidos N°: 8,399,437, publicada el 19 de marzo de 2013. Sin embargo, debe apreciarse que otros correctores de empalmes de moléculas pequeñas, incluidos los correctores de empalmes SMN2 conocidos en la técnica y que serían evidentes para el experto en la materia, están dentro del alcance de esta divulgación.

[0068] Un tercer enfoque es el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO), por ejemplo, para bloquear un silenciador de empalme intrónico SMN2, aumentando así la inclusión de exon7, de nuevo el rescate de la enfermedad en modelos de ratón de SMA (20-22). Biogen/Ionis ha desarrollado nusinersen, un modificador de empalme ASO que muestra eficacia clínica y fue aprobado recientemente por la FDA y comercializado como Spinraza™ (23-25). Sin embargo, cada administración de Nusinersen requiere administración intratecal bajo anestesia general. Además, mientras que el corrector antisentido Nusinersen ha demostrado ser prometedor, la eficacia clínica parece modesta: se informa que el 60% de los pacientes entre la SMA de inicio infantil (tipo I) no responden, y el 43% de los pacientes tratados con Nusinersen no alcanzaron un aumento ≥ 3 puntos. según la escala funcional motora de Hammersmith (ampliada) (HFMSE), mientras que el aumento medio fue inferior a 6 puntos en el grupo de pacientes tratados, en comparación con el placebo. Por lo tanto, el tratamiento con Nusinersen solo logra una mejora parcial.

[0069] Mientras que estas moléculas han demostrado una eficacia significativa preclínica y clínica Nusinersen, ninguna ofrece una cura completa para la enfermedad. En modelos de ratón, aunque tanto la molécula pequeña como los modificadores de empalme de ASO reducen significativamente la gravedad de la enfermedad, los animales tratados tienen, sin embargo, déficits en longevidad, peso corporal, masa muscular y función muscular en comparación con animales sanos (21, 26). En un ensayo clínico doble ciego en SMA de inicio infantil, nusinersen resultó en beneficios clínicamente significativos en el momento del análisis intermedio (el 41% de los tratados frente al 0% de los que recibieron placebo tuvieron mejoras en los hitos motores con el examen neurológico infantil de Hammersmith). Los hitos de la función motora alcanzados son impresionantes para los pacientes de Tipo I, con cinco de los 81 pacientes tratados que pueden sentarse sin ayuda (un hito casi nunca alcanzado en estos pacientes). Sin embargo, estos pacientes no han alcanzado la gama completa de hitos del desarrollo y, en un individuo normal, los hitos alcanzados se considerarían decepcionantes (25). En un segundo ensayo controlado con placebo en SMA Tipo II, nusinersen nuevamente mostró mejoras clínicamente significativas, con puntajes en la Escala de Motor Funcional de Hammersmith - Expandido (HFMSE) aumentando en 5,9 puntos en relación con el grupo de placebo. Tenga en cuenta que la puntuación máxima en el HFMSE es de 66 puntos, y la mayoría de los pacientes de Tipo II puntúan por debajo de 20 (27, 28). No obstante, el 43% de los pacientes no logró una mejora de al menos 3 puntos en la función motora en este ensayo (25). Estos resultados indican que, si bien los moduladores de empalme de SMN2 tienen el potencial de efectos significativos sobre la calidad de vida del paciente con el curso de la enfermedad de SMA, se necesitan ganancias funcionales adicionales para mejorar aún más y reducir la carga de enfermedad.

[0070] Como se usa en este documento, el término "corrector SMN" se refiere a cualquier terapia o compuesto que puede ser usado para aumentar o mejorar la expresión de genes SMN (p. ej., la expresión de genes SMN1 y/o la expresión del gen SMN2), la producción de proteína SMN, y/o actividad SMN funcional. Los correctores SMN, por ejemplo, incluyen correctores/modificadores de empalme que alteran el empalme de las transcripciones SMN2. Cabe señalar que los modificadores de empalme de SMN administrados sistémicamente también pueden afectar el empalme

de SMN en otros tejidos (es decir, no neuronales), donde se expresa SMN.

[0071] Un "corrector SMN" puede ser un corrector central o un corrector sistémico. Se administra un corrector central directamente al sistema nervioso central (SNC) por vía intratecal. Por el contrario, un corrector sistémico puede administrarse por cualquier vía, p. ej., se administra por vía oral y afecta no solo al SNC, sino a otros tejidos del cuerpo.

[0072] En algunas realizaciones, una "proteína SMN funcional" es capaz de promover la función de las neuronas motoras y/o la supervivencia. En algunas realizaciones, una "proteína SMN funcional" es capaz de restaurar completamente la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, una proteína SMN funcional es capaz de restaurar parcialmente la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, una proteína SMN funcional es capaz de restaurar al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más de la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, la proteína SMN de longitud completa es el resultado de la traducción de proteínas (p. ej., en una célula) de un ARNm SMN correctamente empalmada. En algunas realizaciones, una proteína SMN funcional se codifica de SMN2 ARNm que contiene el exón 7.

[0073] En una realización, un "corrector SMN" puede ser una terapia génica, una molécula pequeña, o un oligonucleótido antisentido, como se describe en más detalle aquí. En algunas realizaciones, un corrector de SMN es una molécula de oligonucleótido. En algunas realizaciones, un corrector de SMN es una molécula antisentido. En algunas realizaciones, un corrector SMN puede ser una molécula antisentido que aumenta la expresión de un gen SMN2. En algunas realizaciones, un corrector de SMN puede ser una molécula antisentido que aumenta la expresión de un ARNm de SMN2 que contiene el exón 7. En algunas realizaciones, un corrector de SMN puede ser una molécula antisentido que aumenta la expresión de la proteína SMN funcional, por ejemplo, proteína SMN codificada por el ARNm de SMN2 que contiene el exón 7. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a inhibir un sitio silenciador de corte y empalme intrónico (ISS) en el intrón 7 del gen SMN2 pueden modular el procesamiento del pre-ARNm, lo que lleva a una mayor probabilidad de inclusión del exón 7 en la transcripción de ARNm de SMN2, lo que da como resultado una mayor producción de proteína SMN funcional.

[0074] Los términos "corrector de empalme", "modulador de empalme" y "modificador de empalme", como se usa en este documento, son intercambiables y se refieren a un agente que corrige empalme aberrante de transcripciones de ARN, tales como las codificadas por el gen SMN2 y/o modula la expresión de una proteína SMN. En algunas realizaciones, los correctores de empalme de SMN2 aumentan la inclusión del exón 7 en el pre-ARNm de SMN2. En algunas realizaciones, el aumento de la inclusión del exón 7 en el SMN2 pre-ARNm lleva a una mayor expresión de una proteína SMN funcional (p. ej., de un gen SMN2) en una célula o sujeto, tal como una proteína SMN que es capaz de promover la función y/o supervivencia de las neuronas.

[0075] En una realización, un corrector SMN puede ser una terapia génica. Como se usa en este documento, el término "terapia génica" se refiere a cualquier procedimiento que usa ácidos nucleicos para curar o mejorar de otro modo una condición en un sujeto. En la terapia génica, los ácidos nucleicos deben administrarse a células específicas. Los métodos de administración incluyen medios virales y no virales, que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Patil et al., AAPS J. 7 (1): E61-E77 (2005); Gascon et al., Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy (2013); Somiari y col., Molecular Therapy, 2 (3), 178-187 (2000); Herweijer, H. y JA Wolff, Gene therapy 10 (6): 453-458 (2003); y Nayerossadat et al., Advanced biomedical research 1 (2): 1-11 (2012). Los medios virales para administrar terapia génica implican el uso de vectores virales. Los vectores virales son virus modificados genéticamente que pueden llevar una carga útil genética terapéutica y se han reprogramado para permitir la infección y la posterior transmisión de dicha carga útil a tejidos específicos sin los efectos secundarios típicamente asociados con la infección viral de tipo salvaje. Se pueden usar varios virus como vectores virales, incluidos retrovirus, adenovirus, virus del herpes simple, lentivirus, poxvirus y virus de Epstein-Barr. Si bien son más seguros que los virus de tipo salvaje, los vectores virales pueden inducir una respuesta inmune, lo que ocasionalmente requiere el uso de métodos de administración no virales. En una realización, el vector viral es un vector viral AAV. Los métodos de administración no virales incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, tales como inyección de ADN desnudo, electroporación, bombardeo con pistola de genes y ultrasonido, así como métodos bioquímicos. Otra técnica de administración, la magnetofección, combina elementos físicos y bioquímicos.

[0076] En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" de un corrector SMN es una cantidad de un agente que es capaz de restaurar completamente la función de las neuronas motoras en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, un corrector SMN es un agente que es capaz de restaurar parcialmente la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto). En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" de un corrector de SMN es una cantidad de un agente que es capaz de restaurar al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más de la función de la neurona motora en una célula (p. ej., una célula dentro un sujeto). Un experto en la materia comprenderá que la función de la neurona motora incluye típicamente la excitabilidad de la membrana, el transporte axonal, el tráfico de vesículas, la liberación de neurotransmisores, la función mitocondrial y/o la disponibilidad mitocondrial.

[0077] En algunas realizaciones, un corrector SMN es un agente, por ejemplo, una molécula pequeña o un

oligonucleótido (p. ej., un oligonucleótido antisentido), que aumenta la expresión de una proteína SMN funcional, por ejemplo, mediante la promoción de la inclusión del exón 7 en una transcripción de ARNm de SMN2. En algunas realizaciones, la célula es una célula dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto al que se le administra un corrector de SMN. En algunas realizaciones, un corrector SMN aumenta la cantidad relativa de ARNm de SMN2 que incluye el exón 7 en comparación con el ARNm de SMN2 que no incluye el exón 7 en una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto. En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" de un corrector de SMN aumenta la cantidad de ARNm de SMN2 correctamente empalmado en una célula (p. ej., una célula dentro de un sujeto), de modo que al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más del ARNm de SMN2 dentro de una célula contiene el exón 7. En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" de un corrector de SMN aumenta el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón7 en un sujeto en al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más. En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" de un corrector SMN aumenta el nivel de proteína SMN funcional en un sujeto en al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más.

Orientación de miostatina para mejorar la función muscular - inhibidores de la miostatina

[0078] Un enfoque terapéutico para mejorar la función motora del paciente es apuntar directamente el músculo esquelético para reducir la atrofia muscular y por lo tanto mejorar la fuerza muscular en sujetos que tienen afecciones musculares, como SMA. La inhibición de la miostatina (también conocida como factor de crecimiento y diferenciación 8, o GDF-8) ofrece un enfoque prometedor para aumentar la masa muscular y la función en pacientes con afecciones musculares, como los pacientes con SMA. La miostatina es un miembro de la superfamilia TGF β y un regulador negativo crítico del crecimiento muscular. La pérdida genética de miostatina da como resultado un aumento significativo de la masa muscular, como resultado de la hipertrofia e hiperplasia de las células musculares (29). Al igual que con las mutaciones de pérdida de función de la miostatina, la inhibición farmacológica de la miostatina también aumenta la masa muscular, mediada por la hipertrofia muscular pero no por la hiperplasia (30). Además, la evidencia en modelos animales sugiere que el bloqueo de la señalización de la miostatina previene la atrofia muscular asociada con la inmovilización de las extremidades, la caquexia por cáncer y el tratamiento con corticosteroides (31-34). Desde la descripción inicial del ratón knockout, se han identificado mutaciones en la miostatina y la hipertrofia muscular asociada en ganado, perros y seres humanos. La pérdida de miostatina no parece causar efectos perjudiciales (35-37).

[0079] Los profundos efectos de la pérdida de miostatina sobre la masa muscular, así como la falta de la patología observada con mutaciones de miostatina, ha hecho que este factor de crecimiento de una importante diana terapéutica para indicaciones en las que el desgaste muscular es una característica significativa, incluyendo sarcopenia, caquexia por cáncer, distrofia muscular y atrofia por desuso (38). Varias empresas están siguiendo una variedad de enfoques para inhibir la miostatina y, por lo tanto, aumentar la masa y la fuerza muscular. Los enfoques más comunes para la inhibición de la miostatina son (1) anticuerpos que se unen e inhiben el factor de crecimiento maduro (comúnmente conocido como anticuerpos "neutralizantes"), (2) anticuerpos contra el receptor de miostatina, ActRIIB, (3) trampas de ligandos solubles como ActRIIB-Fc, y (4) expresión mediada por virus de inhibidores de miostatina, como folistatina (39-43). Sin embargo, además de dirigirse a la miostatina, muchas de estas terapias también inhiben a miembros de la familia relacionados, como GDF11 y activinas. Las secuencias de aminoácidos de la miostatina madura y el GDF11 son idénticas en un 90%, lo que hace que sea extremadamente difícil generar anticuerpos que se unan específicamente a la miostatina pero no al GDF11. La miostatina, GDF11 y activinas envían señales a través de ActRIIB; como tales, los anticuerpos que bloquean ActRIIB o las trampas de ligando de ActRIIB soluble inhibirán por tanto las actividades de los tres factores de crecimiento (44). Folistatina es un inhibidor endógeno de la miostatina, que también se une e inhibe el GDF11 y las activinas (45). Varias de estas moléculas también se unen a factores de crecimiento relacionados más lejanamente, como BMP9 y BMP10, aunque con afinidad reducida. Esta falta de especificidad tiene el potencial de producir efectos secundarios no deseados. Si bien se ha dilucidado un papel claro para GDF11 durante el desarrollo, su papel biológico postnatal y los efectos de la inhibición de GDF11 no están claros. Se ha sugerido que el GDF11 es un factor tanto a favor como en contra del envejecimiento, y tanto beneficioso como perjudicial para el crecimiento y la regeneración muscular (46-53). La activina A es crucial para múltiples funciones reproductivas, incluida la liberación de la hormona estimulante del folículo, el desarrollo del folículo y la reparación del endometrio después de la menstruación (54). La BMP9 participa en el mantenimiento de la integridad del epitelio vascular y se cree que la inhibición de este ligando ha provocado telangiectasias y hemorragia gingival observada en pacientes tratados con ACE-031, una fusión de ActRIIB-Fc (41). Juntas, estas observaciones apuntan a la importancia de desarrollar inhibidores selectivos de la señalización de miostatina, a fin de minimizar el riesgo de efectos adversos que pueden ser causados por la inhibición inadvertida de las vías de transducción de señales de uno o más de los factores de crecimiento relacionados. Los inventores de la presente divulgación han reconocido que la especificidad de la inhibición de la miostatina es de particular importancia para minimizar el riesgo de toxicidad, para el tratamiento de pacientes más jóvenes que todavía están en una fase de crecimiento, así como en pacientes que necesitan recibir un tratamiento a largo plazo, que en algunos casos implica el manejo de por vida de una enfermedad.

[0080] Varios inhibidores de la miostatina en el desarrollo, tales como los enumerados anteriormente, todos aumentaron significativamente la masa muscular y la fuerza en roedores; sin embargo, ninguno ha tenido éxito en la consecución de criterios de valoración clínicos primarios en los pacientes (31, 32, 34, 38, 44, 55-57). Se demostró que

MYO-029 de Pfizer, un anticuerpo anti-miostatina, tiene propiedades farmacológicas deficientes, lo que probablemente contribuyó a su fracaso clínico (58). El ACE-031 de Acceleron se suspendió después de eventos adversos de hemorragia, como resultado de la inhibición de BMP9 (41). En otros casos, la causa subyacente de la falla es menos clara. Por ejemplo, varias empresas han llevado sus moléculas a ensayos con pacientes ancianos (p. ej., sarcopenia, personas mayores débiles). Si bien los pacientes en estos ensayos mostraron aumentos modestos en la masa muscular (~2-3%), no hubo una mejora correspondiente en la fuerza muscular (38, 40, 59). Una posibilidad de esta desconexión es que estos ensayos no fueron lo suficientemente largos para detectar mejoras en la función muscular; Es posible que se requiera tiempo adicional para que el sistema nervioso central se adapte a los músculos más grandes. Alternativamente, el potencial anabólico reducido en los ancianos (es decir, expresión reducida de IGF-1 y testosterona, síntesis de proteínas musculares reducida) puede limitar la eficacia de la inhibición de la miostatina en esta población (60, 61). En conjunto, estos resultados advierten que incluso cuando se logra un grado modesto de crecimiento muscular, puede no necesariamente traducirse en una mejor función muscular (p. ej., fuerza, generación de fuerza), por lo tanto, la función motora, como la capacidad de realizar ciertas tareas motoras.

[0081] Tal como se utiliza aquí, el término "inhibidor de la miostatina" se refiere a cualquier agente capaz de bloquear o antagonizar la señalización de miostatina. Dichos agentes pueden incluir antagonistas de molécula pequeña de la miostatina y antagonistas biológicos de la miostatina (p. ej., fragmentos de proteínas y anticuerpos). El inhibidor de miostatina de la presente divulgación puede ser un anticuerpo (incluidos fragmentos del mismo, tales como anticuerpos de dominio (dAbs) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197 y 6.696.245), un inhibidor de molécula pequeña, un Adnectin, un Affibody, un DARPIn, un Anticalin, un Avimer, un Versabody o una terapia génica. Los inhibidores o antagonistas de miostatina conocidos en la técnica hasta la fecha incluyen, pero no se limitan a: PF06252616 (Pfizer); Trevogrumab (Regneron); ACE-083 (Acceleron); BMS-986089 (BMS); Folistatina (en todo el territorio); ACE-031 (Acceleron); Myo-029 (Wyeth); LY2495655 (Eli Lilly); Pinta-745 (Atara); Bimagrumab/BYM338 (Novartis); y anticuerpos anti-miostatina latentes descritos en PCT/JP2015/006323 (Chugai) o cualquier derivado (tales como derivados o fragmentos humanizados o maduros por afinidad) de los mismos, y los anticuerpos anti-miostatina descritos en este documento, p. ej., SRK-015, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El uso de inhibidores de miostatina abarcados por la presente invención también incluye miméticos de anticuerpos, tales como monocuerpos y anticuerpos de dominio único. Los monocuerpos son proteínas de unión sintéticas que normalmente emplean un dominio de fibronectina tipo III (FN3) como andamio molecular. Los monocuerpos incluyen Adnectins™ que se basan en el décimo dominio de fibronectina de tipo III. Un ejemplo de Adnectin es BMS-986089.

[0082] El inhibidor de miostatina para su uso según la presente invención es selectivo para miostatina. Se ha descubierto que muchos agentes descritos en la bibliografía para bloquear las actividades de la miostatina no son selectivos para la miostatina. De hecho, muchos de estos agentes también afectan a otros factores de crecimiento relacionados, GDF11 en particular, que comparte una alta homología de secuencia con la miostatina (~90% de identidad). Para reducir los posibles efectos adversos, se prefieren los agentes que bloquean específicamente la señalización de la miostatina (sin afectar la señalización de otros factores de crecimiento). Esto puede ser particularmente importante para las poblaciones pediátricas y los adultos jóvenes que aún están creciendo y son anabólicamente activos. Por ejemplo, GDF11 juega un papel importante durante el desarrollo temprano. Por tanto, preservar la señalización de GDF11 intacta en individuos en crecimiento puede ser crucial para evitar la perturbación del proceso de desarrollo normal. De manera similar, la intervención altamente selectiva de la señalización de la miostatina sobre otras vías biológicas puede ser ventajosa en situaciones en las que se justifica una terapia a largo plazo, que en algunos casos puede implicar un tratamiento de por vida. De esta manera, cualquier efecto secundario y toxicidad no deseado puede minimizarse o evitarse que se acumule con el tiempo para causar efectos adversos a largo plazo.

[0083] Los inhibidores adecuados de miostatina incluyen productos biológicos, tales como anticuerpos (p. ej., SRK-015). Estos incluyen: i) una clase de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben la etapa de activación de la miostatina de su precursor; ii) una clase de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que neutralizan las actividades de miostatina madura; y iii) una clase de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que bloquea la interacción de la miostatina con su receptor. En algunas realizaciones, se prefieren los anticuerpos de (i) arriba. Se describen ejemplos no limitantes de tales anticuerpos, por ejemplo, en PCT/US2015/059468 y PCT/US2016/052014. En algunas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que son adecuados para llevar a cabo la presente invención comprenden una o más secuencias de CDR, las secuencias de cadena ligera y pesada variables, o las secuencias de cadena pesada y cadena ligera seleccionadas de las descritas en la Tabla 1, Tabla 2 o Tabla 3, a continuación.

Tabla 1: Secuencias de CDR del anticuerpo anti-miostatina

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)
Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSY GMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNK YYADSVKGG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLFLE WSHYYGM DV (SEQ ID NO: 10)	SGSSSNIGS NTVH (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRPSS (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDDS LNGV (SEQ ID NO: 22)
Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSY GMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNK YYADSVKGG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLFLE WSHYYGM DV (SEQ ID NO: 10)	SGSSSNIGS NTVH (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRPSS (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDDS LNGV (SEQ ID NO: 22)
Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSY GMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSIK YYADSVKGG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSN (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLFLE WSHKYGM DV (SEQ ID NO: 11)	SGSTSNIGS NTVH (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRPSS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDEES LNGV (SEQ ID NO: 23)
Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSY GMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSIK YYADSVKGG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSN (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLFLE WSHKYGM DV (SEQ ID NO: 11)	SGSTSNIGS NTVH (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRPSS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDEES LNGV (SEQ ID NO: 23)
Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSY GMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGNKK YYADSVKGG (SEQ ID NO: 8) ISYDGNN (SEQ ID NO: 9)	DLLVRFLFLE WSHKYGM DV (SEQ ID NO: 11)	SGSSNIGG NTVH (SEQ ID NO: 16) SSNIGGNT (SEQ ID NO: 17)	SDDQRPSS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDEES LNGV (SEQ ID NO: 23)

[0084] En la tabla anterior, las secuencias individuales de CDRH3 y CDRL3 reflejan Kabat y IMGT.

Tabla 2: Secuencias de anticuerpos anti-miostatina

Descripción	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
Región variable de cadena pesada	<p>QIQLVQSGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDLLVRFLEWSHYYGMDV</p> <p>WGQGTITVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 24)</p>	<p>CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTCCGACTACTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 38)</p>
Región variable de cadena pesada	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNKNT TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLVRFLEWSHYYGMDV</p> <p>WGQGTITVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 25)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTCCGACTACTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 39)</p>
Región variable de cadena pesada	<p>QIQLVQSGGGVVQPGRSLRL SCAASGFAFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSIKY YADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DLLVRFLEWSHKYGMVDVW</p> <p>GQGTITVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 26)</p>	<p>CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTATCAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTCCGACAAGTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 40)</p>

(Continuación)

Descripción	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
5 10 15 Región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFAPSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSIK YYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDLLVRFLEWSHKYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 27)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTATCAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTTCGCACAAGTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 41)
20 25 30 35 Región variable de cadena pesada	QIQLVQSGGGVVQPGRSLRL SCAASGFAPSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGNK YYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDLLVRFLEWSHKYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28)	CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAATAATAATAACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTTCGCACAAGTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 42)
40 45 50 55 60 65 Región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFAPSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGNK KYYADSVKGRFTISRDNKNT TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLVRFLEWSHKYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 29)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG GATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAATAATAATAACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTG CGATTTTTGGAGTGGTTCGCACAAGTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 43)

(Continuación)

Descripción	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QPVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSSSNIGSNTVHWHYQQLP GTAPKLLIYSDNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLVISGLQSD DEADYYCAAWDDSLNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 30)</p>	<p>CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAG CTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATAATCAGCGCCCCTCAGGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTG GGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGACAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 44)</p>
<p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSSSNIGSNTVHWHYQQLP GTAPKLLIYSDNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCAAWDDSLNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 31)</p>	<p>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAG CTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATAATCAGCGCCCCTCAGGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTG GGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGACAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 45)</p>
<p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>50</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QPVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSTSNIGSNTVHWHYQQLP GTAPKLLIYSDNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLVISGLQSD DEADYYCAAWDESNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 32)</p>	<p>CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAC CTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATGATCAGCGCCCCTCAGGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTG GGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 46)</p>

55

60

65

(Continuación)

Descripción	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSTSNIQSNTVHWYQQLP GTAPKLLIYSDDQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCAAWDESLNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 33)</p>	<p>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAC CTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATGATCAGCGCCCCCTCAGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTG GGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 47)</p>
<p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QPVLTPPPSASGTPGQRVTIS CSGSSNIGGNTVHWYQQLP GTAPKLLIYSDDQRPSGVPD</p> <p>RFSGSKSGTSASLVISGLQSD DEADYYCAAWDESLNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 34)</p>	<p>CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAG</p> <p>CTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATGATCAGCGCCCCCTCAGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTG GGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 48)</p>
<p>40</p> <p>45</p> <p>50</p> <p>Región variable de cadena ligera</p>	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSSNIGGNTVHWYQQLP GTAPKLLIYSDDQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCAAWDESLNGVFG GGTKLTVL</p> <p>(SEQ ID NO: 35)</p>	<p>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC AGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAG CTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCC ACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAAC GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTG ATGATCAGCGCCCCCTCAGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTG GGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAT TATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA</p> <p>(SEQ ID NO: 49)</p>

55

60

65

(Continuación)

Descripción	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>Cadena pesada</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLVRFLEWSHYGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNV D HKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNK G LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQQEEMTKNQVSLTCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 50)</p>	
<p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>Cadena ligera</p>	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSSSNIGSNTVHWHYQQLP GTAPKLLIYSDNQRPSGVPD RFSGSKSGTSAI AISGI OSF DEADYYCAA WDDSLNGVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 51)</p>	

45

50

55

60

65

Tabla 3: Secuencias de anticuerpos anti-miosiatina

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
ESLRF LEDPQ QGGM DV	NSWTR SNNYI	QVQLQSQG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYTFTSY YMHWVRQ APQGLE WMIINPS GGTSYAQ KFQGRVT MTRDTSTS TVYMELSS LRSEDTAV YYCARESL IRFLEDPQQ GGMDVWG QGTTVTVS S	QSALTPAS VSGSPGQSL TISCTGTSS DIGGYNVY SWYQQHPG KAPKLIYD VTDPSGVS GRFSGSKSG NTASLTISG LQTEDEAE YFCNSWTR SNNYIFGGG TKLTVLGQ PKAAPSVTL	YVQLQQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFTSY MHWVRQAPGQGLEWM GIINPSGGSTSYAQKFGQ RVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARES LIRFLEDPQQGGMDVW GGTTTVTVSSGSASAPT LGGGGGGGSAQAQS ALTPASVSGSPGQSLTI SCTGTSSDIGGYNVYVSW YQHPGKAPKLIYDVT DRPSGVSGRFSGSKSGN TASLTISGLQTEDEAEYF CNSWTRSNNYIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPP SS	71-75

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
<p>DRYSS SWG GFDY</p>	<p>QSYDA SSLW V</p>	<p>EVQLVQSG GGVVQSG RSLRLSCV ASGFQSN YGMHWVR QAPGKGLE WLAFIY DGSNKWY ADSVKGRF TISRDNK NALYLQM NSLRAEDT AVYYCAR DRYSSSWG GGFDYWG QGTVLTVS S</p>	<p>NFMLTQPHS VSESPGRTV TIPCSGRGG SIASDSVQW YQQRPGSA PTTIYEDN QRPSGVDP RFSGVDSS SNSASLTI GLRTEDEA DYVCQSYD ASSLWVFG GKTKLTVL GQPKAAPS VTL</p>	<p>EVLVQSGGGVVQSGRS LRLSCV ASGFQSNYGM HWVRQAPGKGLEWLAFLAF IWFYDGSNKWYADSVKGG RFTISRDNKSNALYLQM NSLRAEDTAVYYCARD RYSSSWGQFDYWGQ TVLTVSSGSASAPTLGG GGSGGGGSAANFMLT QPHSVSESPGRTVTIPCS GRGSIASDSVQWYQ RPGSAPTTIYEDNQRP GVPDFRFGSDSSNSAS LTIISGLRTEADYYCQ SYDASSLWVFGGKTKLT VLGQPKAAPS VTLFPSS KASGA</p>	<p>76-80</p>

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
DRHSL GDFD Y	QAWD STTVV	QLLQSQSG GGLVKPGG SLRLSCAA SGFTFSSYS MNWVRQA PGKGLEW VSSISSSS YIYYADSV KGRFTISR DNAKNSLY LQMNSLRA EDTAVYYC VRDRHSLG DFDYWGQ GTLVTVSS GS	SSELTQPSVS VSPGQTATI TCSGDKLG DKYASWYQ QKPGQSPV LVIIY QDTKRPSGI PARFSGSNS GNTATLTIS GTQAMDEA AAYCQAW DSTTVVF GGGTKLTV LGQPKAAP SVTLFPPSS	QLLQSQSGGGLVKPGGS LRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSS ISSSSYIYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCVRDRH SLGDFDYWGQGLVTV SSGSASAPTLGGGSGG GGSAASSELQPPSVS VSPGQTATITCSGDKLG DKYASWYQKPGQSPV LVIIYQDTKRPSGIPARF	81-85

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
HGLM DDSS GYYL SNAF DI	ATWD DSLTG VV	QVQLVQSG AEVKKPGS SVKVSCKA SGGTFSSY AISWVRQA PGQGLEW MGGIPIFG TANYAQKF QGRVTITA DESTSTAY MELSSLRS EDTAVYYC ANHGLMD DSSGY YLS NAFDIWGQ GTMVTVSS GS	QPVLTPPS ASGTPGQR VTISCSGSSS NIGSNTVE WYQQLPGT APKLLIHSN NQRPSGVP DRFSGSRSG TSASLAISG LQSEDEAD YFCATWDD SLTGVVFG GGTTTLTVL GQPKAAPS VTLPFPSS	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSKKASGGTFSSY AIS WVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGTANYAQKFGQGRVT ITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCANHGLMD DSSGY YLSNAFDIWGQG TMVTVSSGSASAPTLGG GSGGGGSAQAQPVLT QPPSASGTPGQRTISCS GSSNIGSNTVEWYQQL PGTAPKLLIHSNNQRPSG VPDRFSGRSRGTASLAI SGLQSEDEADYFCATW DDSLTGVVFGGGTTLTV LGQPKAAPSVTLPFPSS	86-90

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
VGTAA AGDA FDI	AAWD DSLSG WV	QVQLVQSG GGLIQPGG SRLSCAA SGFTVSSY SMNWVRQ APKGLE WVSIISS GSTIYYAD SVKGRFTIS RDNAKNSL YLQMNSLR AEDTALYY CAKVGTA AAGDAFDI WGQGTMV TVSSGS	QPVLTPPS ASGTPGQR VTISCFGSSS NIGSNYYVY WYQQLPGT APKLLIYRN NQRPSGVP DRFSGSKSG TSASLAISG LRSEDEAD YYCAAWD DSLSGWVF GGGTKLTV LGQPKAAP SVTLFPPSS	QVQLVQSGGGLIQPGGSL RLSCAASGFTVSSYSMN WVRQAPGKGLEWVSYI SSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNLSL RAEDTALYYCAKVGTA AAGDAFDIWGGQTMVT VSSGSASAPTLGGGGSG GGSAAQPVLTQPPSA SGTPGQRVTISCFGSSSNI GSNYYVWYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSGVPDR FSGKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCAAWDSDL SGWVFGGGTKLTVLGG PKAAPSVTLFPPSS	91-95

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
<p>VGFD YVWG SYPY DAFDI</p>	<p>QQYGT SPLT</p>	<p>QQLVQSGA EVKKPGAS VKVSCKAS GYTFTSYG ISWVRQAP GQGLEWM GWISAYNG NTNYAQK LQGRVTM TTDTSTST AYMELSSL RSEDTAVY YCARVGFY DYVWGSY PYDAFDIW GQGTMTV VSS</p>	<p>EIVMTQSPG TLSLSPGER ATLSCRASQ SVSSNYLA WYQQKPGQ APRLLIYDA SNRATGIPA RFSGSGGT DFTLTISSE PEDFALYY CQQYGTSP LTFGGGTK LEIK</p>	<p>QQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTSYGI SWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQ GRVTMTTDTSTAYME LSSLRSEDTAVYCARV GFYDYVWGSYPYDAFDI WGQGTMTVTVSSGSASA PTLGGGGSGGGGSAAE IVMTQSPGTLTSLPGERA TLSCRASQSVSSNYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSEPEDFALYYC QQYGTSP LTFGGGTKLEI KRTVAAPS VF</p>	<p>96-100</p>

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
DTSNG GYSSS SFDY	SSYTSS STLV	EVQLVQSG GGLVQPGR SLRLSCAA SGFTFDDY AMHWVRQ APGKGLE WVSGISWN SGSIGYAD SVKGRFTIS RDNAKNSL YLQMNSLR AEDTALYY CAKDTNNG GYSSSSFD YWGQGTL VTVSS	QSALTQPAS VSGSPGQSI TISCTGTSS DVGGINYY SWYQQHPG TAPKLMY DVSYPSPG VSNRFSGSK SGNTASLTI SGLQAEDE ADYYCSSY TSSSTLVFG TGTKVTVL	EVQLVQSGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSG ISWNSGSIGYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMIN SLRAEDTALYYCAKDTIS NGGYSSSSFDYWQQGTL VTVSSGSASAPTLGGGG SGGGGSAQAALTPA SVSGSPGQSIISCTGTSS DVGGINYYSWYQQHPG TAPKLMYDVSYPSPGV SNRFSGSKSGNTASLTI GLQAEDEADYYCSSYTS SSTLVFGTKVTVLGQ PKANPTVTLFPPSS	101-105

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
LVYGG YDEP GYVF DY	AAWD DSLN GWV	EVQLLESRA EVKKGES LKISCKGS GYSFTSYW IGWVRQM PGKGPEW MGIHYPGD SDTRYSPSF QGQVTISA DKISSTAY LQWSSLKA SDTAMYY CARLVYG GYDEPGYY FDYWGQG TLVTVSS	QSVLTQPPS ASGTPGQR VTISCSGSSS NIRSNTVN WYQQLPGT APKLLIYSN NORPSGVP DRFSGSKSG TSASLAISG LQSEDEAD YYCAAWD DSLNGWVF GGGTKLTV L	EVQLLESRAEVKKGESL KISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGPPEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARLVYG GYDEPGYYFDYWGGGT LVTVSSGSASAPTLGGG GSGGGGSAQAQSVLTQP PSASGTPGQRVTISCSGS SSNIRSNTVNWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISG LQSEDEADYYCAAWDD SLNGWVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSKA SGA	106-110

(Continuación)

CDR-H3	CDR-L3	VH	VL	scFV	SEQ ID NOs: de izquierda a derecha
<p>VDGLE YSSG HNFD Y</p>	<p>SSYAG SYTW V</p>	<p>EVQLVQSG GGLVQPGR SLRLSCAA SGFTFDDY AMHWVVRQ APGKGLE WVSGISWN SGSIGYAD SVKGRFTIS RDNSKNTL YLQMNSLR AEDTAVY YCAKVDG LEYSSGHN FDYWGGQ TLVTVSS</p>	<p>QSALTQPPS VSGSPGQSV TISCTGSSS DVGYYDHV SWYQHHPG RAPKVIID VTKRPSGVP DRFSGSKSG NTASLTISG LQAEDEAD YYCSSYAG SYTWVFGG GTELTVL</p>	<p>EVQLVQSGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFDDYAM HWVVRQAPGKGLEWVSG ISWNSGSIGYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYCAKVD GLEYSNGHNFDYWGGQ TLVTVSSGSASAPTLGG GGSGGGGSAQAQALT QPPSVSGSPGQSVTISCT GSSSDVGYDHDVSWYQ HHPGRAPKVIIDVDTKR PSGVPDRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYC SSYAGSYTWVFGGGTEL TVLGPKAAPSVTLPFPPS S</p>	<p>111-115</p>

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[0085] En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que 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 una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena ligera que 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 una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1 comprende una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3, CDRH2 comprende una secuencia como se indica 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 establece 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.

[0086] En una realización, CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 2, CDRH2 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4 o 5, CDRH3 comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 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.

[0087] En una realización, CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 6 o 7, CDRH3 comprende una secuencia como la expuesta 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.

[0088] En una realización, CDRH1 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3, CDRH2 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8 o 9, CDRH3 comprende una secuencia como la expuesta en la 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.

[0089] En realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal adecuado para su uso en la presente invención es SRK-015. SRK-015 une la región del "brazo" dentro del prodominio del complejo de miostatina pro/latente e inhibe la liberación del factor de crecimiento maduro (es decir, GDF-8) del complejo latente/inactivo. La región del brazo de la miostatina se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 116 (RELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSKIQYN KWKAKLWIYLRPVEPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVL QNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR). Otros dominios de miostatina son bien conocidos por los expertos en la técnica y se enumeran, por ejemplo, al menos en la Tabla 2 del documento WO16/073879, publicado el 12 de mayo de 2016.

[0090] La unión de SRK-015 es específica de miostatina pro/latente y, por lo tanto, SRK-015 no se une a GDF-8 o GDF-11 maduros (o cualquier otro miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β), lo que permite el direccionamiento selectivo de la señalización de miostatina, sin afectar otras vías biológicas. Además de esta especificidad de unión, SRK-015 ha demostrado propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) favorables (véanse los Ejemplos 8 y 9) tanto en ratones como en primates no humanos. En algunas realizaciones, la dosis adecuada de SRK-015 para la administración en pacientes humanos para el tratamiento de SMA varía entre 1 y 30 mg/kg, por ejemplo, 1-5 mg/kg, 3-5 mg/kg, 3-10 mg/kg, 5-10 mg/kg, 5-15 mg/kg, 5-20 mg/kg, 10-20 mg/kg, etc. En algunas realizaciones, al paciente se le administra SRK-015 una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, etc.

Terapias de combinación para el tratamiento de la atrofia muscular espinal

[0091] Con base en el reconocimiento de la contribución de los nervios de entrada para la función muscular, se ha descubierto sorprendentemente que, en presencia de un corrector diseñado para promover o mejorar la función de las neuronas motoras, el músculo diana puede producir una mayor capacidad de respuesta a la inhibición de la miostatina, lo que conduce a una mejor función motora. Además, las formas más graves de SMA tienen un inicio temprano, generalmente en niños muy pequeños, que es una población generalmente con una capacidad anabólica sólida adecuada para la intervención con miostatina. Además, los pacientes con SMA tienen dificultades para completar actividades y tareas motoras simples, que a menudo involucran la función de fibras de contracción rápida. En conjunto, la SMA es una indicación clínica que se beneficiará de la inhibición de la miostatina, con el trasfondo de un corrector de SMN.

[0092] Por lo tanto, la invención proporciona terapias de combinación para el tratamiento de SMA, que logran beneficios clínicos mejorados en pacientes en comparación con una monoterapia de cada agente solo. Específicamente, dirigirse a los músculos afectados con un inhibidor específico de la señalización de miostatina

destinado a mejorar la función muscular, junto con un corrector destinado a mejorar la función de las neuronas motoras en los pacientes, produce un resultado clínico beneficioso en relación con este último solo. Dichos efectos pueden ser complementarios, aditivos o sinérgicos en comparación con una monoterapia. Una terapia de combinación que produce medios efectos suplementarios que la totalidad de beneficios clínicos producidos por la terapia de combinación es mayor que las de una monoterapia (p. ej., ya sea una terapia neuronal solo o terapia de inhibición de miostatina solo). Una terapia combinada que produce efectos aditivos significa que los beneficios clínicos de los agentes combinados reflejan una suma de las monoterapias. Una terapia de combinación que produce efectos sinérgicos significa que los beneficios generales logrados en combinación son mayores que los efectos aditivos de cada agente. Además, en algunas realizaciones, debido al aditivo o efectos sinérgicos de una terapia de combinación, dosificación menos frecuente de una o más de las terapias y/o dosis más bajas de una o más terapias, en comparación con la administración de la monoterapia sola, puede usarse. En otras realizaciones, debido a dosis más bajas y/o dosis menos frecuentes de una o más de las terapias de una terapia de combinación puede resultar en menos toxicidad debido a menos efectos secundarios de una o más de las terapias. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una cantidad eficaz de un corrector de SMN utilizado como componente de una terapia de combinación para tratar la SMA en un sujeto es menor que una cantidad eficaz del mismo agente utilizado como monoterapia.

[0093] Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un inhibidor de miostatina como se define en las reivindicaciones, para uso en el tratamiento de SMA, para pacientes que también reciben una terapia para abordar el defecto de la neurona motora, un corrector de SMN. Por tanto, la invención se refiere a métodos para tratar la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto que es tratado con un corrector de SMN, que comprenden la administración de inhibidor de miostatina.

[0094] En algunas realizaciones, un inhibidor de miostatina incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a miostatina madura, o una pro-forma de la miostatina (es decir, miostatina pro- o latente), en una cantidad eficaz para tratar SMA. En el presente documento se describen anticuerpos que se unen a miostatina madura pero que también se unen a GDF11. En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados se unen selectivamente a miostatina madura pero no a GDF11. En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados se unen a miostatina madura y miostatina latente, pero no a pro-miostatina. En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados se unen a la miostatina pro- latente y latente, pero no a la miostatina madura. En algunas realizaciones, tales anticuerpos inhiben la etapa de activación de miostatina estabilizando el complejo de proMiostatina. En algunas realizaciones, tales anticuerpos inhiben la etapa de activación de la miostatina al interferir con una o más etapas de proteólisis. Por ejemplo, en algunas realizaciones, tales anticuerpos inhiben la escisión dependiente de proteasa del prodominio de miostatina. En algunas realizaciones, la proteasa es una proteasa furina o similar a furina, o proteasa tolloide o similar a tolloide. En algunas realizaciones, tales anticuerpos pueden ser sensibles al pH porque el anticuerpo se une a su antígeno a un pH neutro y se disocia a un pH ácido.

[0095] Según la invención, inhibidores de la miostatina se pueden administrar a pacientes con SMA que son respondedores, respondedores pobres, o los no respondedores de una terapia de SMN corrector. Para los que responden mal o no responden, la inhibición concurrente de la señalización de la miostatina puede mejorar la señalización neuromuscular debido en parte a la función muscular mejorada, lo que hace que las neuronas motoras inervantes de los no respondedores respondan mejor al corrector SMN. Sin desear estar ligado a una teoría particular, se contempla que la mejora del componente muscular puede afectar al componente neuronal por retroalimentación positiva, y viceversa, debido a la naturaleza bidireccional de la señalización neuromuscular.

[0096] Aunque correctores SMN de respuesta deficiente y/o no respondedores pueden sin embargo beneficiarse de inhibición de la miostatina, una población de pacientes más preferida incluye los que son respondedores de un corrector SMN. Se contempla que la función motora en estos individuos puede mejorarse aún más mediante la terapia de inhibición de miostatina usada en combinación con la terapia correctora de SMN.

[0097] La "terapia de combinación" de la presente divulgación pretende significar que los efectos farmacológicos de un fármaco (como un corrector de SMN) se superponen in vivo con los efectos farmacológicos de otro fármaco (como un inhibidor de miostatina). Por tanto, los dos fármacos no necesitan administrarse como una única formulación, ni tienen que administrarse simultáneamente ni por la misma vía. Dependiendo de la PK/PD de cada fármaco, por ejemplo, se contempla que el paciente reciba el corrector SMN y el inhibidor de miostatina generalmente dentro de los seis meses de diferencia entre sí para obtener mejores resultados.

[0098] Como se discutió anteriormente, "correctores SMN" adecuados incluyen modificadores de empalme, la sustitución de genes SMN o la terapia génica; potenciadores de la transcripción SMN; potenciadores de la traducción de proteínas SMN; y estabilizadores de proteínas SMN. En algunas realizaciones, tales correctores de SMN pueden ser agentes de moléculas pequeñas, productos biológicos o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el corrector SMN es un modificador de empalme de moléculas pequeñas de Smn2. En algunas realizaciones, el corrector SMN es un modificador de empalme de ARN antisentido de Smn2. En algunas realizaciones, la terapia génica comprende la introducción de uno o más transgenes en el paciente. En algunas realizaciones, la transferencia de genes se logra mediante el uso de un vector adecuado, como vectores virales y portadores basados en lípidos. Para la administración de genes mediada por vectores virales, la terapia génica puede implicar el uso de un serotipo particular para un tratamiento inicial, seguido de un serotipo diferente para el tratamiento posterior, con el fin de minimizar las respuestas

inmunes adversas en el sujeto. En algunas realizaciones, la terapia génica implica la edición del genoma dirigida, como la tecnología CRISPR/Cas9 o una variante de la misma. Los ejemplos no limitantes de correctores de SMN para usar en combinación con un inhibidor de miostatina según la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a: Nusinersen (Biogen); AVXS-101 (AveXis); RG7916 (Roche/PTC/SMAF); RG7800 (Roche/PTC); olesoxima (Roche/Trophos); VYSMN101 (Voyager/Genzyme); LMI070 (Novartis); terapia génica SMN (Genzyme/Sanofi); y oligonucleótido antisentido (RaNA).

Poblaciones de pacientes

[0099] Terapia de combinación descrita en el presente documento puede ser adecuada para el tratamiento de cualquier forma de SMA, por ejemplo, SMA tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV en un sujeto. Un "sujeto", "individuo" o "paciente" se usa indistintamente en este documento, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, ratas, simios, humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas. En una realización, un sujeto es un sujeto humano.

[0100] Las poblaciones de pacientes que pueden beneficiarse de las terapias descritas en la presente memoria incluyen aquellos con SMA no ambulatorio y aquellos con SMA ambulatorio. Estos incluyen pacientes que padecen SMA tipo I, SMA tipo II, SMA tipo III o SMA tipo IV. En algunas realizaciones, el sujeto tiene SMA de tipo II. En algunas realizaciones, el sujeto tiene SMA de tipo III no ambulatorio. En algunas realizaciones, el sujeto tiene SMA de tipo I. En algunas realizaciones, el sujeto tiene SMA ambulatorio de tipo III.

[0101] En algunas realizaciones de la invención, la terapia de combinación que comprende un inhibidor de miostatina y un SMN corrector se considera para las formas no ambulatorias de SMA, como el SMA no ambulatorio de tipo I, tipo II y tipo III. En otras realizaciones de la divulgación, se considera la monoterapia de un inhibidor de miostatina para formas ambulatorias de SMA, tales como SMA ambulatorio de tipo III y de tipo IV. Además, la monoterapia con inhibidor de miostatina puede ser adecuada para tratar a un sujeto que ha sido identificado como portador de una mutación del gen SMN mediante exploración genética. Tal cribado genético puede llevarse a cabo en sujetos recién nacidos/lactantes, así como en el útero (p. ej., feto). Dado que la gravedad de la enfermedad depende en gran medida del número de copias del gen *Smn2* y su expresión, la identificación genotípica por sí sola puede no distinguir suficientemente entre los pacientes muy jóvenes entre aquellos que finalmente desarrollarán formas graves de SMA frente a aquellos que desarrollarán formas más leves de SMA. Por esta y otras razones, la decisión de iniciar una terapia neuronal como un corrector de SMN puede considerarse prematura. Sin embargo, la identificación de una mutación en *Smn1* puede justificar una intervención farmacológica temprana que incluya la inhibición de la miostatina, lo que puede proporcionar beneficios clínicos mientras tanto.

[0102] En algunas realizaciones, el sujeto que tiene SMA tiene entre 0 y 6 meses de edad. El sujeto que tiene SMA puede tener entre 6 y 15 meses de edad. En otra realización, el sujeto que tiene SMA puede tener < 3 años. En otra realización, el sujeto que tiene SMA puede tener > 3 años.

[0103] En una realización, el sujeto se ha identificado que es portador de una mutación SMN, por ejemplo, tiene una mutación en un gen SMN asociado con SMA, como es bien conocido por los de experiencia ordinaria en la técnica, incluyendo la detección genética. En una realización, el sujeto ha sido identificado como portador de una mutación SMN, por ejemplo, mediante exploración genética en el útero o como un bebé.

[0104] Como se usa en el presente documento, el sujeto puede sufrir de daño parcial a la función neuromuscular. La función neuromuscular y/o el daño neuromuscular se miden usando métodos comúnmente conocidos por un experto en la técnica, y se describen con más detalle en el presente documento. Por ejemplo, el daño a la función neuromuscular se puede medir utilizando el potencial de acción muscular compuesto (CMAP), que mide qué tan bien se contrae el músculo en respuesta a la estimulación nerviosa. El daño a la función neuromuscular también se puede medir usando la estimación del número de unidades motoras (MUNE), que determina cuántas unidades motoras forman un nervio dado.

[0105] Los métodos descritos en este documento pueden comprender además la selección de un tema. En alguna realización de la divulgación, el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una afección o trastorno muscular, por ejemplo, SMA. En alguna realización, el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con una señalización neurológica alterada. En una realización, el sujeto puede seleccionarse basándose en el cribado genético, por ejemplo, identificación de una mutación genética, por ejemplo, una mutación genética en SMN, asociada con una enfermedad, p. ej., SMA. En una realización, el sujeto puede seleccionarse basándose en el cribado genético dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento. En otra realización, el sujeto puede seleccionarse basándose en el cribado genético en el útero.

Dosis y administración

[0106] Para practicar los métodos descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica descrita anteriormente se puede administrar a un sujeto (p. ej., un humano) en necesidad del tratamiento a través de una vía adecuada, tal como administración intravenosa, p. ej., en forma de bolo o por infusión continua

durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, inhalatoria o tópica.

5 **[0107]** Los términos "administrar", "administrado" o "administración" incluyen cualquier método de administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un tal anticuerpo o unión a antígeno del fragmento, o un agente, en el sistema de un sujeto o en una región particular en o sobre un sujeto (administración sistémica y local, respectivamente).

10 **[0108]** En algunas realizaciones, se administra al sujeto un inhibidor de miostatina y/o un corrector SMN aproximadamente una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, etc. Típicamente, la dosis adecuada de un inhibidor de miostatina incluye entre aproximadamente 0,1-30 mg/kg. Las consideraciones empíricas, como la vida media, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. Dicho inhibidor de la miostatina se puede administrar mediante inyección/infusión intravenosa. En algunas realizaciones, tal inhibidor de miostatina se puede administrar mediante inyección subcutánea, p. ej., debajo de la piel. En otras realizaciones, el inhibidor de miostatina se puede administrar intratecalmente, por ejemplo, intraespinal. De manera similar, un corrector de SMN, por ejemplo, un modificador de empalme, puede administrarse por vía oral, p. ej. por vía oral.

15 **[0109]** En una realización, el sujeto ha recibido un corrector SMN antes de la administración del inhibidor de miostatina. En otra realización, el sujeto está recibiendo simultáneamente un corrector de SMN al mismo tiempo que la administración del inhibidor de miostatina. En otra realización, el sujeto recibirá un corrector de SMN después de la administración del inhibidor de miostatina.

20 **[0110]** En una realización, el sujeto ha recibido un corrector SMN dentro de los 6 meses de la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto ha recibido un corrector de SMN dentro de los 3 meses posteriores a la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto ha recibido un corrector de SMN dentro de los 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses o 1 mes de la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto ha recibido un corrector de SMN dentro de las 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas o 1 semana de la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto ha recibido un corrector de SMN el mismo día de la administración del inhibidor de miostatina.

25 **[0111]** En una realización, se espera que el sujeto reciba un corrector SMN dentro de los 6 meses de la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, se espera que el sujeto reciba un corrector de SMN dentro de los 3 meses posteriores a la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, se espera que el sujeto reciba un corrector de SMN dentro de los 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses o 1 mes de la administración del inhibidor de miostatina. En una realización, se espera que el sujeto reciba un corrector de SMN dentro de las 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas o 1 semana de la administración del inhibidor de miostatina.

30 **[0112]** En una realización, el componente SMN corrector de la terapia de combinación es un nucleótido antisentido y se administra al sistema nervioso central del sujeto a través de la inyección intratecal. En una realización, el nucleótido antisentido se administra al sujeto cada pocos meses, p. ej., mensualmente, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada cinco meses, cada seis meses o cada 12 meses. En otra realización, un tratamiento inicial puede implicar una dosificación más frecuente, seguida de una dosis de mantenimiento menos frecuente a partir de entonces.

35 **[0113]** En otra realización, el componente SMN corrector de la terapia de combinación es una molécula pequeña y se administra por vía oral al sujeto. En una realización, la molécula pequeña se administra al sujeto diariamente. En otra realización, la molécula pequeña se administra al sujeto semanalmente, quincenalmente o mensualmente.

40 **[0114]** En una realización, el componente SMN corrector de la terapia de combinación es una terapia de genes y se administra mediante inyección intravenosa. En una realización, el corrector SMN es una terapia génica y se administra mediante inyección intratecal. En una realización, un tratamiento inicial puede incluir una dosificación más frecuente, seguida de una dosis de mantenimiento menos frecuente a partir de entonces. Pueden ser preferibles dosis de mantenimiento menos frecuentes para evitar respuestas inmunes inadecuadas a la terapia génica.

45 **[0115]** En una realización, el componente inhibidor de miostatina de la terapia de combinación se administra al sujeto por medio de la administración intravenosa. En una realización, la porción inhibidora de miostatina de la terapia de combinación se administra al sujeto mediante administración oral. En una realización, el componente inhibidor de miostatina de la terapia de combinación se administra al sujeto mediante inyección subcutánea. En una realización, el inhibidor de miostatina se administra al sujeto diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente. En una realización, un tratamiento inicial puede implicar una dosificación más frecuente, seguida de una dosis de mantenimiento menos frecuente a partir de entonces.

50 **[0116]** Una "cantidad eficaz" para tratar la SMA, como se usa en este documento, puede ser una cantidad para lograr la eficacia clínica, que incluye, pero no se limita a: retrasar o aliviar la atrofia muscular; retrasar la pérdida de las neuronas motoras α ; prevenir o reducir la expresión de marcadores musculares; prevenir, aliviar o retrasar los depósitos de grasa intramuscular (reemplazo de grasa del tejido muscular); prevenir o retrasar el uso del ventilador/respirador; retrasar el tiempo hasta que un paciente quede en silla de ruedas; aumentar la puntuación de la

Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada en ≥ 1 punto en comparación con el grupo de control no tratado, o en ≥ 1 punto desde el valor inicial medido antes del tratamiento corrector; retrasar la disminución progresiva de una escala de motor funcional ampliada de Hammersmith durante un período de 12 meses, 24 meses o 36 meses; aumentar una puntuación de CHOP INTEND en ≥ 3 puntos en comparación con el control no tratado; aumentar una puntuación de MFM-32 en al menos 1 punto en comparación con el control no tratado; retrasar la transición de SMA ambulatorio a SMA no ambulatorio; una reducción en el número de hospitalizaciones, etc. Cada una de estas medidas se describen con más detalle a continuación.

[0117] Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a 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.

[0118] Mientras que las terapias de combinación que comprenden un inhibidor de miostatina y un corrector neuronal se prefieren generalmente, en algunos casos, la monoterapia de inhibidores de la miostatina puede ser considerado. Poblaciones de pacientes adecuados consideradas para tal monoterapia incluyen aquellos con formas más leves de SMA, como el SMA ambulatorio de tipo III y el tipo IV (p. ej., Adultonset) SMA. Basado en el requisito del criterio (ii) discutido en detalle anteriormente, los pacientes que tienen la capacidad de caminar, por ejemplo, han retenido una función neuromuscular suficiente. Por tanto, la inhibición de la miostatina puede proporcionar beneficios para mejorar la función muscular en estos pacientes incluso en ausencia de una terapia correctora neuronal concurrente. Por consiguiente, (monoterapia que comprende un inhibidor de miostatina para el tratamiento de formas leves de SMA (p. ej., SMA ambulatorio) también se da a conocer.

[0119] En algunas realizaciones de la descripción, la monoterapia con inhibidor de miostatina para el tratamiento de pacientes con SMA ambulatorio de tipo III pueden ayudar a retrasar la progresión de la enfermedad en SMA no ambulatorio. En algunas realizaciones, los pacientes que reciben monoterapia con inhibidor de miostatina pueden mantener o incluso mejorar la función motora, en comparación con el grupo de control (diagnóstico similar pero sin la monoterapia). Sin embargo, cabe señalar que estos pacientes responden a los inhibidores de la miostatina en ausencia de una terapia neuronal, lo que puede potenciar los beneficios de la inhibición de la miostatina. En algunas realizaciones, la monoterapia con inhibidor de miostatina para el tratamiento de pacientes con SMA ambulatorio comprende administrar al sujeto un inhibidor de miostatina en una cantidad eficaz para producir un resultado clínicamente significativo en el documento. En estas realizaciones, el resultado clínico clínicamente significativo corresponde a una puntuación mejorada en la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de al menos 1 punto (≥ 1) más alta que la del grupo de control no tratado, o al menos 1 punto (≥ 1) más alta que la línea base medida antes. En algunas realizaciones, el resultado clínico significativo puede corresponder a una puntuación mejorada en la Escala de Motor Funcional de Hammersmith expandida de al menos 1 punto (≥ 1) sobre la línea de base o corregida antes de recibir una terapia correctora de SMN o la terapia inhibidora de miostatina, respectivamente. En otras realizaciones, puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de al menos 2 puntos (≥ 2), al menos 3 puntos (≥ 3), al menos 4 puntos (≥ 4), al menos 5 puntos (≥ 5), al menos 6 puntos (≥ 6), al menos 7 puntos (≥ 7), al menos 8 puntos (≥ 8), al menos 9 puntos (≥ 9), al menos 10 puntos (≥ 10), al menos 12 puntos (≥ 12), al menos 15 puntos (≥ 15), al menos 20 puntos (≥ 20), al menos 25 puntos (≥ 25), al menos 30 puntos (≥ 30), al menos 35 puntos (≥ 35), al menos 40 puntos (≥ 40), al menos 45 puntos (≥ 45), al menos 50 puntos (≥ 50), o al menos mínimo 60 puntos (≥ 60), por encima de la línea de base o corregido medido antes de recibir una terapia correctora de SMN o la terapia con inhibidor de miostatina, respectivamente. En algunas realizaciones, el resultado clínico significativo puede corresponder a una puntuación mejorada de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith expandida de al menos 1 punto (≥ 1) sobre el grupo de control no tratado. En algunas realizaciones, el resultado clínico significativo puede corresponder a una puntuación mejorada en la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de al menos 2 puntos (≥ 2), al menos 3 puntos (≥ 3), al menos 4 puntos (≥ 4), al menos 5 puntos (≥ 5), al menos 6 puntos (≥ 6), al menos 7 puntos (≥ 7), al menos 8 puntos (≥ 8), al menos 9 puntos (≥ 9) o al menos 10 puntos (≥ 10), al menos 12 puntos (≥ 12), al menos 15 puntos (≥ 15), al menos 20 puntos (≥ 20), al menos 25 puntos (≥ 25), al menos 30 puntos (≥ 30), al menos 35 puntos (≥ 35), al menos 40 puntos (≥ 40), al menos 45 puntos (≥ 45), al menos 50 puntos (≥ 50) o al menos 60 puntos (≥ 60) sobre el grupo de control no tratado.

[0120] En algunas realizaciones, la terapia con inhibidor de miostatina proporcionada en este documento puede ayudar a mantener el estado de la enfermedad en una población de pacientes que recibe el inhibidor de miostatina, en comparación con el grupo de control que no lo recibe. El mantenimiento del estado de la enfermedad se refiere a prevenir un mayor deterioro del músculo afectado, o retrasar o ralentizar la velocidad de progresión de la enfermedad, por ejemplo, según lo evaluado por los cambios en la función motora a lo largo del tiempo, en estos pacientes. Por lo tanto, incluso cuando no se muestre ninguna mejora en las puntuaciones de las pruebas de función motora, la terapia con inhibidores de miostatina puede proporcionar beneficios clínicos al contrarrestar la progresión de la enfermedad. Por tanto, tales beneficios clínicos pueden presentarse como un período de tiempo más largo observado en donde la población de pacientes tratados con el inhibidor de miostatina mantiene puntuaciones de pruebas anteriores, o muestra una tasa más lenta de disminución en las puntuaciones a lo largo del tiempo, en comparación con un grupo de control.

Efectos Biológicos de inhibidores de la miostatina y correctores SMN

[0121] Los efectos clínicos de un inhibidor de miostatina, solo o en combinación con un corrector SMN, descritos aquí pueden ser monitoreados y/o evaluados para la eficacia por diversos medios. En este documento se proporcionan ejemplos de tales efectos biológicamente beneficiosos. Pueden conseguirse efectos biológicos beneficiosos en un sujeto mediante la administración de inhibidores de miostatina en combinación con correctores de SMN. En algunas realizaciones, el inhibidor de miostatina y/o corrector de SMN se administra en una cantidad eficaz para provocar uno o más de los efectos biológicos descritos a continuación.

[0122] La capacidad de evaluar las escalas funcionales que se pueden medir de forma fiable en pacientes con SMA es crucial en el seguimiento de la progresión de la enfermedad de los pacientes, así como efectos de la terapia con el tiempo. Si bien la función muscular puede evaluarse mediante mediciones fisiológicas, como la fuerza muscular y la generación de fuerza, las escalas funcionales motoras monitorean la progresión de la enfermedad de maneras que se relacionan con la funcionalidad de los pacientes en la vida cotidiana y tienen más significado y relevancia que una medida que cuantifica la fuerza *per se*. A continuación se proporciona una lista de varias pruebas de evaluación funcional motora conocidas que se pueden utilizar para evaluar a los pacientes con SMA, aunque no pretenden ser limitantes. Otras pruebas incluyen, entre otras, la medición de la función motora gruesa (GMFM), la prueba de caminata de 6 minutos, la prueba de caminata/carrera de 10 metros, la prueba de tiempo para levantarse del piso, la prueba cronometrada y listo (TUG), y la prueba de subir escaleras, cuyos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Escala de Motor funcional Hammersmith ampliada

[0123] La gravedad de la enfermedad de un paciente que tiene SMA, tanto antes del tratamiento, durante el tratamiento, y después del tratamiento con un inhibidor de miostatina descrito aquí, se pueden clasificar utilizando muchas pruebas y ensayos bien conocidos por personas de ordinaria habilidad en la técnica. La escala de motor funcional de Hammersmith, expandida (HFME) es un criterio de valoración validado para SMA no ambulatorio de tipo II y tipo III, y es bien conocido por los expertos en la técnica. El sistema de evaluación consta de 33 ítems (p. ej., tareas o actividades motoras) que evalúan la función motora. Los elementos que son principalmente actividades motoras impulsadas por la fuerza de corta duración que requieren fibras de contracción rápida tipo II incluyen: sentarse sin apoyo para las manos durante 3 segundos; sentarse a acostarse; rodando de la espalda al abdomen; empujar el cuerpo hacia arriba durante 3 segundos; arrodillado hasta la posición de pie; subir/bajar 4 escalones de escaleras; saltar 12 pulgadas hacia adelante, etc.

[0124] En algunas realizaciones, el sujeto tiene una línea de base de Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de < 66 antes de recibir un corrector o un tratamiento con inhibidores de la miostatina ("línea base"), p. ej., ≤ 65 , ≤ 60 , ≤ 55 , ≤ 50 , ≤ 40 , ≤ 35 , ≤ 30 , ≤ 25 , ≤ 20 , etc. En una realización, el sujeto tiene una Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de ≤ 50 antes de recibir un corrector o un inhibidor de la miostatina. En una realización, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de referencia de ≤ 40 antes de recibir un corrector o un inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de referencia de ≤ 35 antes de recibir un corrector o un inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de referencia de ≤ 30 antes de recibir un corrector o un inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de referencia de ≤ 25 antes de recibir un corrector o un inhibidor de miostatina. En una realización, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de referencia de ≤ 20 antes de recibir un corrector o un inhibidor de miostatina.

[0125] En algunas realizaciones, el sujeto tiene un aumento de puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada (o "corregida") después de una terapia de corrector SMN. En algunas realizaciones, el sujeto ha mejorado la puntuación en al menos 3 puntos, al menos 4 puntos, al menos 5 puntos, al menos 6 puntos, al menos 7 puntos, al menos 8 puntos, al menos 9 puntos, al menos 10 puntos, al menos 11 puntos, al menos 12 puntos, al menos 13 puntos, al menos 14 puntos, o al menos 15 puntos, sobre la línea de base, después de recibir el corrector SMN. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una puntuación aumentada en la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada después de una terapia correctora de SMN. En algunas realizaciones, el sujeto ha mejorado la puntuación en al menos 3 puntos, al menos 4 puntos, al menos 5 puntos, al menos 6 puntos, al menos 7 puntos, al menos 8 puntos, al menos 9 puntos, al menos 10 puntos, al menos 11 puntos, al menos 12 puntos, al menos 13 puntos, al menos 14 puntos, o al menos 15 puntos. En algunas realizaciones, con el tratamiento con inhibidor de miostatina además (es decir, terapia de combinación), el sujeto mejora aún más la puntuación en al menos 3 puntos, al menos 4 puntos, al menos 5 puntos, al menos 6 puntos, al menos 7 puntos, al menos 8 puntos, al menos 9 puntos, al menos 10 puntos, ya sea por encima de la línea de base medida antes de recibir el tratamiento corrector SMN o en comparación con un grupo de control no tratado.

[0126] Por ejemplo, muchos pacientes con SMA no ambulatorios tienen la puntuación de Hammersmith de referencia que varía de 15 a 30 puntos, de un total de 66 puntos. Como resultado de una terapia correctora de SMN, estos pacientes pueden mejorar la puntuación en promedio de 4 a 10 puntos sobre la línea base respectiva. Con la terapia combinada que incluye un inhibidor de miostatina, estos pacientes pueden mejorar aún más la puntuación. En algunas

realizaciones, dichos pacientes mejoran la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada en 1-20 puntos sobre la línea base respectiva. En algunas realizaciones, dichos pacientes mejoran adicionalmente la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada en al menos un punto sobre una puntuación ya corregida medida después de la terapia correctora de SMN.

[0127] Los pacientes para los SMA, importancia clínica de incluso un solo punto de diferencia en varios sistemas de puntuación de prueba del motor es notable. Para poner esto en perspectiva, ejemplos se proporcionan a continuación con fines ilustrativos, en base a los artículos de la prueba del sistema de HFMSE estándar para los pacientes de SMA no ambulatorios:

[0128] Tareas 1 y 2 de la prueba de HFMSE implican sentarse (sin soporte de la espalda) durante más de 3 segundos. Se otorgan 2 puntos si el paciente puede sentarse sin apoyo para las manos durante una cuenta de 3 o más; 1 punto por mantener el equilibrio contando hasta 3 con una mano como apoyo; y 0 puntos por requerir ambas manos para mantener el equilibrio. En un entorno de la vida real, la diferencia entre la capacidad de sentarse sin usar una mano como apoyo (2 puntos) y la necesidad de usar una mano simplemente para mantener el equilibrio (1 punto) es enorme, porque en el primer caso el paciente puede usar ambas manos para realizar actividades (como sostener un artículo) mientras está sentado. La tarea 3 de la prueba evalúa si el paciente, mientras está sentado, puede levantar una mano para tocar la cabeza por encima del nivel de la oreja. La capacidad de realizar esta tarea aparentemente simple puede marcar la diferencia para poder peinarse o ponerse un sombrero sin ayuda.

Medición de la función motora (MFM)

[0129] La prueba de Medición de Función Motora (MFM) proporciona una escala genética para evaluar diversos parámetros de la función motora en pacientes con SMA de diversos grados de gravedad de la enfermedad, incluyendo niños y ambulatorios y no ambulatorios adultos de aproximadamente 6 y 62 años. Existen múltiples versiones de MFM que se adaptan a diferentes poblaciones de pacientes. Por ejemplo, MFM32 es adecuado para niños mayores de 6 años, mientras que MFM20, que es una versión modificada, ha sido validado para niños menores de 6 años. MFM se ha empleado con éxito en ensayos clínicos para monitorear o detectar cambios en la función motora en pacientes, que reflejan el deterioro con el tiempo (ver, por ejemplo, Clinicaltrials.gov NCT02628743).

[0130] En una realización, un sujeto que tiene SMA y que se administra una terapia de terapia o combinación descrita en este documento presenta un aumento de puntuación de MFM de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Módulo de miembro superior (ULM)

[0131] La prueba del módulo de miembro superior (ULM) proporciona una evaluación de la función del brazo que ha sido diseñada específicamente como un módulo adicional. El ULM está diseñado para capturar el desempeño de las actividades de la vida diaria que normalmente no se incluyen en las medidas de la función motora gruesa. La evaluación incluye 9 elementos de actividades que se pueden realizar de manera confiable en los niños y tardas ~ 10 minutos para completarse. El ULM se ha utilizado en un entorno multicéntrico y en ensayos clínicos.

[0132] En una realización, un sujeto que tiene SMA y se le administra una terapia o terapia de combinación descrita en este documento exhibe un aumento en la puntuación ULM de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Módulo de miembro superior revisado

[0133] El módulo de miembro superior revisado (RULM) permite la evaluación de la función del brazo en pacientes con SMA que ha demostrado una buena validez y fiabilidad, lo que es adecuado para su uso en la investigación clínica. El RULM incluyó 20 ítems de actividades que podrían ser completadas con éxito por niños de hasta 30 meses. Estos artículos incluyen tareas como llevar las manos del regazo a la mesa, recoger artículos pequeños, presionar botones, rasgar papel, abrir un contenedor Ziploc, llevar las manos por encima de los hombros y levantar artículos de diferente peso a diferentes alturas. Las medidas de resultado son pruebas que utilizan los investigadores para evaluar si un determinado tratamiento en prueba tiene algún efecto en el paciente. Usar la medida de resultado correcta es vital para asegurarse de que un ensayo pueda probar si funciona un tratamiento. Según SMA News Today, RULM capturó efectivamente la debilidad muscular progresiva en el extremo débil del espectro.

[0134] Se informa que la prueba de caminata de seis minutos (6MWT) es una evaluación funcional confiable y válida en pacientes con SMA, que puede capturar un elemento de fatiga de la enfermedad. Por ejemplo, la fatiga observada en los pacientes de prueba de SMA reflejó una disminución del 17% en la velocidad de la marcha desde el primer minuto hasta el último minuto durante la 6MWT.

[0135] En una realización, un sujeto que tiene SMA y al que se le administra una terapia o terapia de combinación descrita en este documento exhibe un aumento en la puntuación RULM de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Puntuación de CHOP INTEND

5 **[0136]** El CHOP INTEND es un cuestionario calificado por un médico desarrollado para evaluar la habilidad motora en la atrofia muscular espinal tipo I. Los 16 elementos se puntúan de 0 a 4. La puntuación global varía de 0 a 64, indicando una puntuación más alta mejores habilidades motoras. (Ver: Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, Scott C, Pane M, Messina S, Bertini E, Mercuri E, Finkel RS. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): desarrollo de pruebas y confiabilidad. *Neuromuscul Disord.* 2010 Mar; 20 (3): 155-61). CHOPS INTEND está validado y se ha demostrado que es confiable en sujetos SMA Tipo I. Se derivó en parte de TIMP (Test of Infant Motor Performance) y está diseñado para medir la función motora en bebés débiles con enfermedad neuromuscular. La prueba incluye movimientos reflejos activos (espontáneos, dirigidos a una diana) y provocados, pero no incluye evaluaciones respiratorias o de alimentación.

15 **[0137]** En una realización, un sujeto que tiene SMA y que se administra una terapia o terapia de combinación descrita en el presente documento presenta un aumento en al menos uno de los 16 artículos CHOP de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces , o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Prueba CMAP

20 **[0138]** Daño neuromuscular puede evaluarse utilizando un potencial de acción muscular compuesto (CMAP) de prueba que proporciona una estimulación eléctrica de un nervio y registra el potencial de acción muscular compuesto de electrodos de superficie que recubren un músculo suministrada por ese nervio. La prueba puede implicar estimulación en la muñeca, el codo y, con menos frecuencia, la axila y el plexo braquial.

25 **[0139]** El CMAP mide la respuesta de voltaje sumada de los potenciales de acción de las fibras musculares individuales. Por lo general, los electrodos se colocaron sobre un músculo diana del sujeto y el CMAP se obtuvo dando estímulos supramáximos (es decir, un estímulo que tiene una fuerza significativamente superior a la requerida para activar todas las fibras nerviosas o musculares en contacto con el electrodo), que se repitieron cada 30-60 segundos durante un período de 2-3 minutos hasta que se obtuvo una amplitud de línea base estable. Luego, el sujeto contrajo los músculos objetivo durante 2-5 minutos, con un breve descanso (3-4 segundos) cada 15 segundos para prevenir la isquemia muscular. El CMAP se registró cada minuto cuando se ejercita el músculo y cada 1-2 minutos después del ejercicio durante un periodo de 30 minutos o hasta que no se observó una disminución adicional en la amplitud del CMAP. La amplitud de CMAP se mide típicamente en milivoltios (mV). El porcentaje de disminución de amplitud se calculó restando la menor amplitud después del ejercicio de la mayor amplitud después del ejercicio y dividiéndola por la mayor amplitud después del ejercicio. En las pruebas de CMAP realizadas en un grupo de personas sin enfermedad muscular, la disminución de la amplitud de CMAP varió del 5,4% al 28,8% (media del 15%). Una disminución de más del 40% en la amplitud de CMAP se consideró diagnóstico de enfermedad muscular.

40 **[0140]** En algunas realizaciones, la disminución de la amplitud de CMAP en un sujeto es al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, o más. En algunas realizaciones, la amplitud del pico negativo de CMAP en un sujeto con una enfermedad muscular (p. ej., SMA) es sustancialmente menor en comparación con la amplitud correspondiente del pico negativo de CMAP en un sujeto sin enfermedad muscular (sujeto de control). En una realización, la amplitud del pico negativo de CMAP en un sujeto con una enfermedad muscular es al menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90% o más, menor que la amplitud correspondiente del pico negativo de CMAP en un sujeto de control. La prueba CMAP puede usarse para determinar la eficacia de la terapia comparando las disminuciones de CMAP antes y después del tratamiento, como se describe en el presente documento.

50 **[0141]** En una realización, un sujeto que tiene SMA y que se administra una terapia de terapia o combinación descrita en este documento presenta un aumento de la CMAP de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Prueba de MUNE

55 **[0142]** La estimación del número de la unidad motora (MUNE) es una prueba que se puede utilizar para determinar el número aproximado de neuronas motoras en un músculo o grupo de músculos. La prueba MUNE proporciona un valor calculado que representa el número estimado de neuronas motoras o axones (entrada de control motor) que inervan el músculo o grupo de músculos que se están evaluando. Además, MUNE proporciona un medio para medir el tamaño de la unidad motora y permite rastrear la pérdida de neuronas motoras. La prueba MUNE se usa generalmente con mayor frecuencia en trastornos neuromusculares como la esclerosis lateral amiotrófica y la atrofia muscular espinal.

65 **[0143]** Normalmente, en una prueba MUNE, los electrodos bipolares en la superficie de la piel estimulan el nervio con la fuerza suficiente para activar todos los axones motores dentro de él, lo que resulta en la despolarización y contracción completa del músculo, que se corresponde con la activación de todos sus unidades motoras (es decir, neuronas motoras o axones) y fibras musculares componentes en el sitio de colocación de los electrodos. El impulso eléctrico generado por esta actividad muscular se registra mediante electrodos colocados sobre el músculo en la

superficie de la piel. En un músculo sano, todas las unidades motoras y todas sus fibras musculares se activan simultáneamente durante esta prueba, generando el potencial de acción motora compuesta (CMAP), que es la respuesta motora máxima. La amplitud del CMAP corresponde al número total de unidades motoras y fibras musculares activadas. La amplitud de la tercera respuesta en cada sitio se suma y luego se divide por 9 para obtener la amplitud promedio del potencial de acción de una sola unidad motora (SMUP). Esta amplitud se divide en la amplitud máxima del potencial de acción de la unidad motora compuesta (CMAP) para producir el MUNE.

[0144] El MUNE promedio para sujetos normales, saludables es 225 (± 87), y, por ejemplo, fue 41,9 (± 39) entre los sujetos con una enfermedad muscular (p. ej., ALS o SMA) al inicio del estudio. Los sujetos que tienen afecciones o trastornos musculares exhiben claras disminuciones con el tiempo, con una tasa promedio de disminución de hasta aproximadamente el 9% por mes. En una realización, la tasa promedio de disminución mensual en los valores MUNE en un sujeto con una enfermedad o trastorno muscular es al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% o más, en relación con los valores MUNE correspondientes en un sujeto de control sin enfermedad muscular. Es posible que un sujeto con una enfermedad muscular pueda tener medidas de amplitud de CMAP normales pero un valor MUNE inferior al 50% del sujeto de control. En una realización, el sujeto con valores normales de amplitud de CMAP tiene un valor MUNE que es al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% o más, menor en relación con los correspondientes valores MUNE en un sujeto de control sin enfermedad muscular.

[0145] En una realización, un sujeto que tiene SMA y al que se le administra una terapia o terapia de combinación descrita en este documento presenta un aumento de un valor MUNE de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces después de la administración de la terapia o terapia de combinación.

Efecto sobre la masa y/o función del músculo en el sujeto humano

[0146] Administración de un inhibidor de miostatina y/o función de un tejido muscular en el sujeto humano. En algunas realizaciones, el tejido muscular se selecciona del grupo que consiste en un tejido de músculo liso, un tejido de músculo esquelético y un tejido de músculo cardíaco. El tejido del músculo liso está formado por células alargadas que se estrechan, generalmente involuntarias y se diferencia del músculo estriado en la proporción mucho más alta de actina/miosina, la ausencia de sarcómeros llamativos y la capacidad de contraerse a una fracción mucho más pequeña de su longitud en reposo. Las células del músculo liso se encuentran particularmente en las paredes de los vasos sanguíneos, rodeando el intestino y en el útero. El tejido del músculo cardíaco es un tejido estriado pero involuntario responsable de la actividad de bombeo del corazón de los vertebrados. Las células individuales del músculo cardíaco no se fusionan en estructuras multinucleadas como lo están en el tejido muscular estriado. El tejido del músculo esquelético está bajo control voluntario. Las fibras musculares son sincitiales y contienen miofibrillas, matrices en tándem de sarcómeros. Hay dos tipos generales de fibras del músculo esquelético: contracción lenta (p. ej., fibras de tipo I) y contracción rápida (p. ej., fibras de tipo II) según la expresión de la isoforma de cadena pesada de miosina (MHC) particular. Los músculos de contracción lenta suelen estar mejor equipados para trabajar aeróbicamente y ayudan a permitir acciones de mayor duración como las carreras de distancia, mientras que los músculos de contracción rápida suelen fatigarse más rápido, pero están mejor equipados para trabajar anaeróbicamente y se utilizan en ráfagas poderosas de movimientos como esprintar. La diferenciación entre fibras musculares de contracción lenta y rápida se basa en la tinción histoquímica para miosina adenosina trifosfatasa (ATPasa) y el tipo de cadena pesada de miosina. La fibra muscular de contracción lenta (predominantemente fibra de tipo I) es la isoforma I del MHC y las tres isoformas de contracción rápida (predominantemente fibras de tipo II) son la isoforma IIa del MHC, la isoforma IIb del MHC y la isoforma IIc del MHC (S. Schiaffino, J. Muscle Res. Cell. Motil., 10 (1989), págs. 197-205). En algunas realizaciones, aumenta la masa y/o función de un tejido muscular de contracción rápida en el sujeto humano. En otras realizaciones, aumenta la masa y/o función de un tejido muscular de contracción lenta en el sujeto humano.

[0147] En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de miostatina, p. ej., un anticuerpo, o unión a antígeno del fragmento de la misma, que se describe en el presente documento a un sujeto puede causar un aumento en la masa muscular. Preferiblemente, tal aumento en la masa muscular es clínicamente significativo para beneficiar o mejorar de otro modo el estado de salud del sujeto. Por ejemplo, cambios clínicamente significativos en la masa muscular pueden mejorar la movilidad, el autocuidado, el metabolismo, etc. del paciente. En algunas realizaciones, el aumento de la masa muscular es un aumento de los músculos magros. En algunas realizaciones, tal aumento de la masa muscular es un efecto sistémico de manera que los músculos de todo el cuerpo o sustancialmente todo el cuerpo muestran el efecto medible. En otras realizaciones, los efectos se localizan en cierto grupo/tipo de músculos.

[0148] En algunas realizaciones, la masa del tejido muscular, por ejemplo, tejido muscular magro, aumenta en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la masa del tejido muscular, p. ej., tejido muscular magro, se incrementa en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%. Tal aumento de la masa muscular se puede deducir o medirse por cualquiera de los métodos conocidos adecuados, incluyendo la medición de la sección transversal a través de IRM (p. ej., la sección transversal de antebrazo), la circunferencia, la anchura diafragma (p. ej., a través de ultrasonido), etc.

[0149] en algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se describe en el presente documento a un sujeto puede causar una mejora en la función muscular. La función muscular puede evaluarse mediante una variedad de medidas, que incluyen, entre otras: generación de fuerza, fuerza de agarre (p. ej., fuerza de agarre máxima), resistencia, capacidad oxidativa muscular, resistencia de agarre dinámico, etc. En algunas realizaciones, los niveles de creatinina sérica se utilizan como un biomarcador validado indicativo de masa muscular, aunque con una sensibilidad limitada.

[0150] En algunas realizaciones, la administración de la función locomotora aumenta inhibidores de la miostatina en el ser humano sujeto. En algunas realizaciones, la función locomotora del sujeto humano aumenta en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la función locomotora del sujeto humano aumenta en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

[0151] En otra realización, la administración del inhibidor de miostatina aumenta la fuerza muscular en el ser humano sujeto. En algunas realizaciones, la fuerza muscular del sujeto humano aumenta en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la fuerza muscular del sujeto humano aumenta en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

[0152] En algunas realizaciones, la administración del inhibidor de miostatina y/o corrector de SMN puede provocar cambios clínicamente significativos en la función muscular que corresponde a la funcionalidad mejorada del paciente. En algunas realizaciones, funcionalidad mejorada incluye la mejora en la movilidad del paciente, el cuidado personal, el metabolismo, etc.

Efecto sobre el nivel de depósitos de grasa intramuscular

[0153] La administración del inhibidor de miostatina y/o corrector SMN afecta el nivel de los depósitos de grasa intramuscular en el sujeto humano. En una realización, se previene, alivia o retrasa la sustitución de grasa del tejido muscular. Como se usa en este documento, el término "tejido adiposo" se refiere a la grasa que incluye el tejido conectivo que almacena la grasa. El tejido adiposo se deriva de los preadipocitos.

[0154] La masa de tejido adiposo se puede determinar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo puede medirse mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). La cuantificación de los depósitos de grasa intramuscular también se puede determinar mediante imágenes por resonancia magnética (IRM). Por ejemplo, la técnica de RM de resonancia magnética de doble eco de doble ángulo de volteo de gradiente estropeado (SPGR) o la técnica de RM de Dixon de tres puntos se pueden utilizar para evaluar los niveles de depósitos de grasa intramuscular en un sujeto. Las técnicas de resonancia magnética antes mencionadas y los protocolos para cuantificar los depósitos de grasa intramuscular se describen, por ejemplo, en Leroy-Willig et. al., Magnetic Resonance Imaging Vol. 15, No 7 págs. 737-744, 1997, y Gaeta y col., Skeletal Radiol, DOI 10.1007/s00256-011-1301-5. Debe apreciarse, sin embargo, que otros métodos para determinar y cuantificar los depósitos de grasa intramuscular son conocidos en la técnica y resultarán evidentes para el experto en la materia.

[0155] En algunas realizaciones, el nivel de reemplazo de los depósitos de grasa intramuscular se reduce en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% después de la administración de la terapia al sujeto.

Efecto sobre la calidad de vida del sujeto humano

[0156] La evaluación de la calidad de vida en pacientes con afecciones graves o crónicas, tales como pacientes con SMA, puede implicar enfoques integrados para evaluar diversos aspectos de parámetros físicos, mentales, sociales y otros. Generalmente, un mayor grado de calidad de vida se asocia con factores como: accesibilidad a la tecnología de asistencia; reintegración comunitaria; funcionalidad con miembros inferiores y movilidad para caminar y/o ruedas; salud mental; severidad en deterioro neurológico y disfunción autonómica; el manejo del dolor; independencia funcional y autocuidado; fuerza de las extremidades superiores; y control de la espasticidad. La administración de un inhibidor de miostatina descrito en este documento aumenta la calidad de vida del sujeto humano para lograr una mejora clínicamente significativa medida por una prueba estandarizada de calidad de vida /sistema.

[0157] Un número de ensayos adecuados para evaluar la calidad de vida en pacientes son conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación: la Medición de Independencia de Médula Espinal (SCIM); Medida de Independencia Funcional (FIM); Cuestionario de calidad de vida para la incontinencia (I-QOL); Cuestionario de satisfacción con la vida (LISAT-9, LISAT-11); Índice de calidad de vida (QLI); Perfil de calidad de vida para adultos con discapacidades físicas (QOLP-PD); Calidad de Bienestar (QWB) y Calidad de Bienestar Autoadministrado (QWB-SA); Qualiveen; Satisfacción con la escala de vida (SWLS, Deiner Scale); Formulario abreviado 36 (SF-36); Perfil de impacto de enfermedad 68 (SIP 68); y Calidad de Vida-BREF de la Organización Mundial de la Salud (WHOQOL-BREF).

[0158] En algunas realizaciones, la calidad de vida se evalúa de acuerdo con el sistema de puntuación de calidad de

vida SF-36, que es un sistema de puntuación validado, en donde un cambio de 8 puntos se considera clínicamente significativo. En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina da como resultado una mejora clínicamente significativa en una puntuación de prueba de calidad de vida estandarizada.

5 **[0159]** Como se usa en el presente documento, el término "mejora clínicamente significativa" se refiere a una mejora significativa sobre un nivel estándar. En algunas realizaciones, las puntuaciones de calidad de vida de SF-36 de un paciente se incrementan en al menos 8 puntos, después del tratamiento con una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo descrito en este documento, en comparación con la puntuación del paciente antes del tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes obtienen puntuaciones más altas según la evaluación de la prueba de calidad de vida SF-36, por ejemplo, al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o 50 puntos aumentan en las puntuaciones del Sistema de puntuación de calidad de vida SF-36. En otras realizaciones, las puntuaciones del Sistema de puntuación de calidad de vida SF-36 aumentan en al menos aproximadamente 8-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 8-20, 8-30, 8-40 o 8-50.

15 **[0160]** En algunas realizaciones, una o más mediciones de calidad de vida se emplean para evaluar la calidad de vida de los pacientes antes y después del tratamiento con los inhibidores de la señalización de miostatina descritos en este documento. Las ventajas de esta prueba incluyen: i) es fácil de administrar; ii) evalúa tanto la función física como la salud mental; y, iii) está altamente validado para una serie de indicaciones clínicas.

20 *Efecto sobre la prevención de la pérdida de masa muscular o atrofia*

[0161] La administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina y/o los correctores SMN previenen, retrasan, o alivian la pérdida muscular o atrofia en el sujeto humano con riesgo de desarrollar pérdida de masa muscular y/o atrofia. En algunas realizaciones, la pérdida o atrofia muscular se reduce o previene en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la pérdida o atrofia muscular se reduce o previene en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100% en comparación con el grupo de control que no recibe un inhibidor de miostatina y/o un corrector de SMN.

30 **[0162]** En realizaciones particulares, el grupo de control al que se hace referencia anteriormente solo se ha tratado con un corrector SMN. En una realización diferente, el grupo de control mencionado anteriormente no ha sido tratado con un corrector SMN.

[0163] La administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina y/o corrector de SMN puede dar como resultado la prevención de un mayor deterioro del músculo afectado, o retrasar o ralentizar la velocidad de progresión de la enfermedad en estos pacientes. En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina y/o corrector de SMN puede retrasar la pérdida o atrofia muscular en el sujeto humano con riesgo de desarrollar pérdida y/o atrofia muscular, en comparación con el grupo de control que no recibe inhibidor de miostatina y/o corrector SMN. En algunas realizaciones, la pérdida o atrofia muscular se retrasa durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 2 años, 3 años, 5 años o 10 años en el sujeto humano que recibe inhibidor de miostatina y/o corrector SMN, en comparación con el grupo de control que no recibe inhibidor de miostatina y/o corrector SMN. En realizaciones particulares, el grupo de control al que se hace referencia anteriormente solo se ha tratado solo con el corrector SMN. En una realización diferente, el grupo de control mencionado anteriormente no se ha tratado con el corrector SMN.

45 **[0164]** La prevención del deterioro adicional del músculo afectado se refiere a mantener el estado de la enfermedad que incluye, por ejemplo, mantener las puntuaciones de las pruebas funcionales motoras durante periodos de tiempo más largos en comparación con el control, una velocidad más lenta de progresión de la enfermedad, medida/monitorizada mediante una prueba de función motora; menos hospitalizaciones, menos lesiones (p. ej., fracturas óseas), tiempo más largo antes de ventilador que requiere, tiempo más largo antes de convertirse en silla de ruedas, etc.

50 **[0165]** Prevención de la pérdida de masa muscular o atrofia por el uso de un inhibidor de miostatina y/o el corrector de SMN descrito en el presente documento puede controlarse o evaluarse fácilmente mediante cualquier método adecuado para evaluar la función motora que implica los músculos afectados.

Efectos sobre la homeostasis ósea

60 **[0166]** La administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina puede proporcionar una protección clínicamente significativa de los huesos en los pacientes. Dichos efectos incluyen, pero no se limitan a: aumento de la densidad ósea; aumento de la masa ósea; aumento de la densidad mineral ósea; aumento de la fuerza ósea; prevención de la pérdida ósea; y reducir la frecuencia de fracturas óseas en pacientes. La técnica está familiarizada con técnicas adecuadas que se pueden emplear para medir varios parámetros de la homeostasis ósea. Estos incluyen técnicas de imagen, como la exploración por micro CT y la absorciometría de rayos X de energía dual central (DXA central).

65

Efectos sobre la regulación metabólica

[0167] La administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina puede proporcionar efectos clínicamente significativos sobre la regulación metabólica. Estos efectos incluyen, pero no se limitan a: prevención del desarrollo de desregulación metabólica en pacientes; y aliviar la desregulación metabólica en pacientes.

i) Efecto sobre la sensibilidad a la insulina del sujeto humano

[0168] Métodos para medir la sensibilidad a la insulina son conocidos en la técnica, por ejemplo, prueba de tolerancia a la glucosa, y el ayuno de insulina o la prueba de la glucosa. Durante una prueba de tolerancia a la glucosa, un paciente en ayunas toma una dosis oral de glucosa de 75 gramos y luego se miden los niveles de glucosa en sangre durante las siguientes dos horas. Una glucemia inferior a 7,8 mmol/L (140 mg/dl) se considera normal, una glucemia de entre 7,8 y 11,0 mmol/L (140 a 197 mg/dl) se considera tolerancia a la glucosa alterada (IGT) y una glucemia de mayor o igual a 11,1 mmol/L (200 mg/dl) se considera diabetes mellitus. Para la prueba de insulina en ayunas, un nivel de insulina sérica en ayunas superior a 25 mUI/L o 174 pmol/L se considera resistencia a la insulina. En algunas realizaciones, la tasa metabólica aumenta en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la tasa metabólica aumenta en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

ii) Efecto sobre el nivel de tejido adiposo en el sujeto humano

[0169] Administración del inhibidor de miostatina, p. ej., anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a miostatina pro/latente afecta el nivel de tejido adiposo en el sujeto humano. Como se usa en este documento, el término "tejido adiposo" se refiere a la grasa que incluye el tejido conectivo que almacena la grasa. El tejido adiposo se deriva de los preadipocitos. Su función principal es almacenar energía en forma de lípidos, aunque también amortigua y aísla el organismo. Los dos tipos de tejido adiposo son el tejido adiposo blanco (WAT), que almacena energía, y el tejido adiposo marrón (BAT), que genera calor corporal.

[0170] Se sabe que el tejido adiposo marrón (BAT) funciona en la disipación de la energía química en respuesta al frío o exceso de alimentación, y también tiene la capacidad de equilibrio de energía modular. Se ha demostrado que la activación del tejido adiposo pardo mejora la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en humanos, lo que sugiere que cualquier persona con una función de insulina alterada podría beneficiarse de la activación de BAT (Stanford et al., J Clin Invest. 2013, 123 (1): 215-223).

[0171] Los tejidos adiposos beige se generan como resultado del pardeamiento de WAT, también conocido como beiging. Esto ocurre cuando los adipocitos dentro de los depósitos de WAT desarrollan características de BAT. Los adipocitos beige adquieren un aspecto multilocular (que contiene varias gotitas de lípidos) y aumentan la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1). Al hacerlo, estos adipocitos blancos que normalmente almacenan energía se convierten en adipocitos que liberan energía (Harms et al. Nature Medicine. 2013, 19 (10): 1252-63).

[0172] La grasa visceral o grasa abdominal (también conocida como grasa de órganos o grasa intraabdominal) se encuentra dentro de la cavidad abdominal, empaquetada entre los órganos (estómago, hígado, intestinos, riñones, etc). La grasa visceral es diferente de la grasa subcutánea debajo de la piel y la grasa intramuscular intercalada en los músculos esqueléticos. La grasa en la parte inferior del cuerpo, como en los muslos y las nalgas, es subcutánea y no es un tejido espaciado constantemente, mientras que la grasa en el abdomen es principalmente visceral y semifluida. Un exceso de grasa visceral se conoce como obesidad central, o "grasa abdominal", en la que el abdomen sobresale excesivamente y nuevos desarrollos como el Índice de Volumen Corporal (BVI) están específicamente diseñados para medir el volumen abdominal y la grasa abdominal. El exceso de grasa visceral también está relacionado con diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, enfermedades inflamatorias y otras enfermedades relacionadas con la obesidad (Mokdad et al., JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2001, 289 (1): 76-9).

[0173] La masa de tejido adiposo se puede determinar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo puede medirse mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).

[0174] Administración del inhibidor de miostatina, p. ej., anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a miostatina pro/latente aumenta el nivel de tejido adiposo marrón y/o el nivel de tejido adiposo beige en el sujeto humano. Por otro lado, la administración del inhibidor de miostatina, p. ej., el anticuerpo de miostatina anti-pro/latente, o su porción de unión a antígeno, disminuye el nivel de tejido adiposo blanco y tejido adiposo visceral en el sujeto humano.

[0175] En algunas realizaciones, el nivel de tejido adiposo marrón o beige aumenta en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, el nivel de tejido adiposo marrón o beige se incrementa en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

[0176] En algunas realizaciones, el nivel de tejido adiposo blanco o visceral se reduce en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, el nivel de tejido adiposo blanco o visceral se reduce en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

iii) Efecto sobre la relación de tejido adiposo a músculo en el sujeto humano.

[0177] La administración del inhibidor de miostatina, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a miostatina pro/latente disminuye la relación entre tejido adiposo y muscular en el sujeto humano. En algunas realizaciones, la proporción entre tejido adiposo y muscular disminuye en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la proporción entre tejido adiposo y muscular se reduce en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

iv) Efecto sobre la absorción de glucosa en el sujeto humano

[0178] La administración del inhibidor de miostatina, p. ej., anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la miostatina pro/latente afecta la captación de glucosa por los tejidos en el sujeto humano. En algunas realizaciones, aumenta la captación de glucosa por el tejido muscular. Por ejemplo, la captación de glucosa por el tejido muscular aumenta en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas realizaciones, la captación de glucosa por el tejido muscular aumenta en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

[0179] En otras realizaciones, la captación de glucosa por el tejido adiposo blanco, el tejido del hígado y el tejido del vaso sanguíneo se reduce. En algunas realizaciones, la captación de glucosa por el tejido adiposo blanco, tejido hepático y tejido de vasos sanguíneos se reduce en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la captación de glucosa por el tejido adiposo blanco, el tejido hepático y el tejido de los vasos sanguíneos se reducen en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

v) Efecto sobre la infiltración de grasa intramuscular en el sujeto humano

[0180] La administración del inhibidor de miostatina, p. ej., anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a miostatina pro/latente disminuye la infiltración de grasa intramuscular en el sujeto humano. En algunas realizaciones, la infiltración de grasa intramuscular se reduce en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En otras realizaciones, la infiltración de grasa intramuscular se reduce en al menos aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20%, 1-30%, 1-40%, 1-50%, 10-50%, 20-30%, 20-60%, 30-80%, 40-90% o 50-100%.

Efecto de retrasar la pérdida de α -neuronas motoras

[0181] La administración de una cantidad eficaz del inhibidor de miostatina puede retrasar la pérdida de α -neuronas motoras. La técnica está familiarizada con las técnicas adecuadas que se pueden emplear para medir diversos parámetros que indican la pérdida de α -neuronas motoras. Estas incluyen métodos de inmunofluorescencia que utilizan técnicas de imagen, como la fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF, bioensayos de Cisbio), la exploración por micro CT y la microscopía de luz y electrónica.

Expresión de biomarcadores

[0182] Los cambios en el nivel de ciertos biomarcadores (p. ej., los biomarcadores plasmáticos) de SMA pueden medirse para vigilar la progresión de la patología, así como la capacidad de respuesta de los pacientes al tratamiento. Se conocen en la técnica métodos y ensayos adecuados para medir cambios en el nivel de biomarcadores adecuados de muestras de pacientes. Por tanto, los métodos de detección se pueden usar para detectar ARNm, proteína, ADNc o ADN genómico, por ejemplo, en una muestra biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína marcadora incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern. Las técnicas *in vivo* para la detección de ARNm incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína marcadora incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o su fragmento. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas de formación de imágenes estándar.

[0183] Más específicamente, el control de la influencia de agentes (p. ej., inhibidores de la miostatina y/o correctores SMN) en el nivel de expresión de un marcador se puede aplicar no sólo en fármaco básico de detección, sino también en ensayos clínicos, así como para evaluar el mantenimiento y la progresión de la enfermedad y la capacidad de respuesta de los pacientes a una terapia en particular. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar la expresión del marcador puede monitorizarse en muestras biológicas recogidas de sujetos que reciben tratamiento para SMA, por ejemplo, antes, durante y/o después del tratamiento y midiendo los niveles de los marcadores y/o cambios en los niveles de expresión del marcador a lo largo del tiempo. En el presente documento se describe un método para controlar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de preadministración de un sujeto antes de la administración del agente o agentes; (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados de la divulgación en la muestra previa a la administración; (iii) obtener una o más muestras posteriores a la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión del marcador o marcadores en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión del marcador o marcadores en la muestra previa a la administración con el nivel de expresión del marcador o marcadores en la muestra o muestras posteriores a la administración; y (vi) evaluar la eficacia del régimen terapéutico y, si es necesario, modificar o ajustar el tratamiento en consecuencia. Por ejemplo, una mayor expresión del gen o genes marcadores durante el curso del tratamiento puede indicar una dosis ineficaz y la conveniencia de aumentar la dosis. A la inversa, la expresión disminuida del gen o genes marcadores puede indicar un tratamiento eficaz y no es necesario cambiar la dosis.

[0184] Los biomarcadores adecuados incluyen proteínas plasmáticas descritas en Kobayashi et al. (2013) PLOS ONE, volumen 8, número 4, e60113. Se prefieren uno o más biomarcadores presentes en las muestras de suero para facilitar la recogida de muestras, aunque en ciertos casos pueden usarse biomarcadores musculares, por ejemplo, recogidos mediante biopsia de tejido.

[0185] En algunas realizaciones, marcadores de proteínas de plasma SMA se seleccionan de entre la lista siguiente: CILP2 (proteína de capa intermedia de cartílago 2); TNXB (Tenascin XB); CLEC3B (familia 3 del dominio de lectina de tipo C, miembro B (tetranectina)); TNXB (Tenascin XB); ADAMTSL4 (ADAMTS tipo 4); THBS4 (trombospondina 4); COMP (proteína de matriz oligomérica de cartílago); CRTAC1 (proteína ácida de cartílago 1); F13B (factor de coagulación XIII, polipéptido B); PEPD (peptidasa D); LUM (Lumican); CD93 (componente 1 del complemento, subcomponente q, receptor 1); complemento mixto C2/B; APCS (componente P amiloide, suero); VTN (vitronectina); DPP4 (dipeptidilpeptidasa 4 (CD26, proteína complejante de adenosina desaminasa 2)); CRP (proteína C reactiva, relacionada con pentraxina); HBB (hemoglobina beta); GSN (gelesolina); NCAM1 (molécula de adhesión de células neurales 1); Factor CFI I (complemento); APOA4 (apolipoproteína AIV); VTN (vitronectina); F13A1 (factor de coagulación XIII, polipéptido A1); INHBC (inhibina, beta C); RPS27A (precursor de ubiquitina y proteína ribosómica S27a); CDH13 (Cadherin 13, Hcadherin (corazón)); Complemento mixto C2/B; C2 Componente 2 del complemento; CP (ceruloplasmina (ferroxidasa)); HBA (subunidad alfa de hemoglobina); QSOX1 (Quiescina Q6); LRG1 (alfa2-glicoproteína 1 rica en leucina); C9 (componente de complemento 9); SERPINA10 (inhibidor de la peptidasa de Serpin, clado A (antiproteinasas alfa1, antitripsina), miembro 10); ALP (fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón); receptor III-A/B de fc-gamma mixto; PROC (Proteína C (inactivador de los factores de coagulación Va y Villa)); VCAM1 (molécula de adhesión de células vasculares 1); GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); OMD (osteomodulina); IGKVD41 (variable 41 de inmunoglobulina kappa); IGFBP6 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 6); PTPRG (proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, G); S100A9 (proteína A9 de unión a calcio S100 (calgranulina B)); VNN1 (Vanin 1); SERPIND (inhibidor de la peptidasa de serpina, clado D (cofactor de heparina), miembro 1); CA1 (anhidrasa carbónica I); CTSD (catepsina D (aspartil peptidasa lisosómica)); HP (Haptoglobina); SELENBP1 (proteína de unión a selenio 1); ORM2 (Orosomucoide 2); PRDX2 (peroxiredoxina 2); AOC3 (amina oxidasa, cobre que contiene 3 (proteína de adhesión vascular 1)); COL6A3 (colágeno, tipo VI, alfa 3); PZP (proteína de la zona del embarazo); COL6A1 (colágeno, tipo VI, alfa 1); PARK7 (enfermedad de Parkinson (autosómica recesiva, inicio temprano) 7); THBS1 (trombospondina 1); CAT (catalasa); LCP1 (proteína citosólica de linfocitos 1 (Lplastin)); AFM (Afinin); HPR (proteína relacionada con la haptoglobina); SELL1 (selectina L (molécula de adhesión de linfocitos 1)); ENG (Endoglin); PFN1 (Profilina 1); PI16 (inhibidor de peptidasa 16); SERPINA6 (inhibidor de la peptidasa de serpina, clado A (antiproteinasas alfa1, antitripsina), miembro 6); F9 (factor de coagulación IX); PROCR (receptor de proteína C, endotelial); ORM1 (Orosomucoide 1); NEO1 (homólogo 1 de Neogenin); MMRN2 (multimerina 2); LGB (Beta-lactoglobulina); CNTN4 (contacto en 4); SHBG (globulina fijadora de hormonas sexuales); CA2 (anhidrasa carbónica II); IGFBP5 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 5); PLTP (proteína de transferencia de fosfolípidos); FGA (cadena alfa de fibrinógeno); TPM4 (tropomiosina 4); MB (mioglobina); SPP1 (osteopontina); AXL (receptor de tirosina quinasa AXL); APSC (componente P amiloide, suero); CRP (proteína C reactiva, relacionada con pentraxina); CCL22 (ligando 22 de quimiocina (motivo CC) (quimiocina derivada de macrófagos)); THBD (trombomodulina); CALCA (calcitonina); LEP (leptina); NPPB (péptido natriurético cerebral b); MMP2 (metaloproteinasas de matriz 2); CK (músculo/hueso de creatina quinasa); ACE (enzima convertidora de angiotensina); FAPB3 (proteína de unión a ácidos grasos (corazón)); CD40 (ligando de CD40); MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos); ANGPT2 (angiopoyetina 2); AHSG (alfa-2-HS-glicoproteína (fetuina A)); CFH (factor de complemento H); IL8 (interleucina 8); C3 (complemento componente 3); PPY (polipéptido pancreático); VEGFA (factor de crecimiento endotelial vascular); TF (transferrina); PGF (factor de crecimiento placentario); EGF (factor de crecimiento epidérmico); GSTA1 (glutatión S transferasa alfa); SOD1 (superóxido dismutasa 1); VCAM1 (molécula de adhesión de células vasculares 1); PAI1 (inhibidor 1 del activador de plasminógeno); CSF1 (factor estimulante de colonias de macrófagos 1); S100A12 (S100 Proteína A12); VTN (vitronectina); FASLG (ligando Fas); AIM (alfa-1-microglobulina); AST (transaminasa de aspartate); ACCT (alfa-1-anticimotripsina); CCL3 (ligando 3 de quimiocina

(motivo CC) (proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos)); SORT1 (Sortilin); TBG (globulina fijadora de tiroxina); APOA1 (apolipoproteína A1); MPO mieloperoxidasa); B2M (microglobulina Beta 2); EPO (eritropoyetina); MMP10 (metaloproteínasa 10 de matriz); PROS1 (proteína S dependiente de vitamina K); MMP7 (metaloproteínasa de matriz 7); AGER (receptor de productos finales de glicosilación avanzada); IL18 (interleucina 18); CCL11 (ligando 11 del motivo de quimiocina CC); IGA (inmunoglobulina A); péptido C (péptido de proinsulina C); A2M (alfa-2-macroglobulina); PDGF BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas); CCL16 (ligando 16 del motivo de quimiocina CC); IL1A (interleucina 1 alfa); APOA4 (apolipoproteína A4); MMP9 (metaloproteínasa de matriz 9); SPP1 (osteopontina); CLEC3B (familia 3 del dominio de lectina de tipo C, miembro B (tetranectina)); IGFBP6 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 6); FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos (adipocito)); CHI3L1 (similar a quitinasa 3 1 (YKL-40)); LEP (leptina); CTSD (catepsina D); MST1 (estimulador de macrófagos 1 (similar al factor de crecimiento de hepatocitos)); MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos); S100A4 (proteína A4 de unión a calcio S100); GLO1 (glioxalasa 1 (lactoilglutación liasa)); ENG (Endoglin); FTL1 (tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (factor de crecimiento endotelial vascular receptor)); ERBB2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)); NDKB (isoforma B de nucleósido fosfatasa quinasa); PRDX-4 (peroxiredoxina 4); PLAUR (activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa); IL6R (receptor de interleucina 6); CCL24 (ligando 24 de quimiocina (motivo CC) (eotaxina 2)); GSN (gelesolina); PSAT1 (fosfoserina aminotransferasa 1); y TGFB1 (factor de crecimiento transformante beta 1).

[0186] En algunas realizaciones, los biomarcadores se seleccionan de la siguiente lista, que representa regresores 13 de SMA de la función motora en dos poblaciones de SMA: COMP; AXL; CD93 PEPD; THBS4; LUM; MEGABYTE; DPP4; SPP1; CHI3L1; CDH13; APCS; y LEP.

[0187] Adicionalmente, o alternativamente, cualesquiera mediciones fisiológicas adecuadas conocidas en la técnica puede llevar a cabo para evaluar la función muscular, incluyendo, por miografía de impedancia eléctrica (EIM), resonancia magnética de imagen de músculo cuantitativa (qMRI), la absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), etc.

Terapias para la promoción de hipertrofia muscular

[0188] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un inhibidor de miostatina para la promoción de la hipertrofia muscular para mejorar la función muscular en un sujeto que ha retenido o recuperado la capacidad anabólica en el músculo, caracterizado que la vía anabólica (maquinaria celular para la producción de proteínas) está suficientemente intacta (es decir, funcional y activa).

[0189] Si bien este es el caso típico de los sujetos jóvenes/crecimiento (p. ej., la población pediátrica), para los sujetos de mayor edad, los músculos pueden haber perdido la capacidad de anabólicos robustos; en otras palabras, el equilibrio anabólico-catabólico tiende a inclinarse hacia este último. Para que la inhibición de la miostatina produzca efectos óptimos en estos sujetos, se contempla que se administre un agente que estimula la vía anabólica junto con un inhibidor de la miostatina. Al potenciar simultáneamente el brazo anabólico de las vías celulares, el músculo diana puede volverse más sensible a los efectos de la inhibición de la miostatina.

[0190] Típicamente, la función muscular en un sujeto que ha retenido o recuperado la capacidad anabólica se evalúa mediante la administración de hormonas anabólicas para el sujeto, como la testosterona, y la medición de sus efectos sobre el crecimiento y la fuerza muscular. La respuesta de estos sujetos a las hormonas anabólicas se puede medir mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

[0191] En algunas realizaciones de la divulgación, un sujeto que se beneficia de aumento de masa muscular se administra un inhibidor de miostatina, tal como los descritos en el presente documento. En el caso de que el tratamiento de inhibición de miostatina no produzca beneficios significativos en el sujeto, la administración adicional de un estimulador anabólico puede considerarse como una terapia de combinación para potenciar el efecto del inhibidor de miostatina de acuerdo con la presente descripción.

[0192] Sujetos que pueden beneficiarse debido al aumento del crecimiento muscular pueden o no presentar síntomas clínicos de miopatía. Por lo tanto, tal uso puede proporcionar un beneficio para la salud de individuos generalmente "sanos", que sin embargo pueden beneficiarse de una función muscular mejorada, que puede incluir un aumento en la masa muscular, una capacidad mejorada para realizar ciertas funciones motoras (tareas), etc.

[0193] Los inhibidores de miostatina descritos en este documento, ya sea como monoterapia o como terapia de combinación, son adecuados para tratar pacientes que presentan uno o más síntomas clínicos de una miopatía. Como se usa en este documento, el término "miopatía" se refiere a una condición muscular caracterizada por una estructura o función muscular deteriorada, que típicamente resulta en debilidad muscular. Una "miopatía" también puede incluir una condición muscular caracterizada por una estructura muscular normal pero una entrada neuronal alterada o anormal, que a su vez afecta la función muscular. Una "miopatía" también puede incluir miopatías inflamatorias y/o miopatías autoinmunes, por ejemplo, miastenia gravis.

[0194] Las miopatías incluyen afecciones musculares que son de naturaleza neuromuscular o musculoesquelética. En algunas realizaciones de la divulgación, la miopatía es una miopatía hereditaria. Las miopatías hereditarias

incluyen, sin limitación, distrofias, miotonias, miopatías congénitas (p. ej., miopatía nemalínica, miopatía de multinúcleo y miopatía centronuclear), miopatías mitocondriales, miopatías periódicas familiares, miopatías inflamatorias y miopatías metabólicas (p. ej., enfermedades por almacenamiento de glucógeno y trastorno de almacenamiento de lípidos). 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 debido a otros agentes tóxicos), miositis (p. ej., dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión), miositis osificante, rabdomiolisis, mioglobulinurias y atrofia por desuso. En algunas realizaciones, la miopatía es una atrofia por desuso, que puede ser causada por un desuso prolongado de los músculos, lo que conduce al deterioro de la función muscular normal. La atrofia por desuso puede ser el resultado de una hospitalización, una fractura ósea (p. ej., una fractura de cadera) o una lesión nerviosa. En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con una enfermedad o trastorno tal como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinal (SMA), síndromes de caquexia debido a insuficiencia renal, SIDA, afecciones cardíacas y/o cáncer. En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con el envejecimiento. En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con la sarcopenia. En algunas realizaciones, la miopatía está relacionada con la atrofia del músculo paraespinal (PMA).

[0195] En algunas realizaciones de la divulgación, la miopatía es una miopatía primaria. En una realización, una miopatía primaria comprende atrofia por desuso. En algunas realizaciones, la atrofia por desuso está asociada con fractura de cadera, reemplazo de articulación electivo, miopatía de cuidados críticos, lesión de la médula espinal o accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, la miopatía es una debilidad muscular genética asociada, por ejemplo, con una distrofia muscular.

[0196] En algunas realizaciones de la divulgación, la miopatía es una miopatía secundaria, en donde la pérdida de músculo o disfunción es secundaria a una patología de la enfermedad. En algunas realizaciones, la miopatía secundaria comprende denervación o caquexia. En algunas realizaciones, la miopatía secundaria está causada por una denervación asociada con la disfunción de la neurona del motor. En algunas realizaciones, la disfunción de las neuronas motoras se debe a mutaciones genéticas que afectan a las neuronas motoras. Las enfermedades que se sabe que implican mutaciones en neuronas motoras incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular espinal (SMA). En algunas realizaciones, la miopatía secundaria es una caquexia asociada con insuficiencia renal, SIDA, una afección cardíaca, cáncer o envejecimiento. En algunas realizaciones, la miopatía secundaria es causada por una lesión nerviosa, incluida una lesión nerviosa no deseada sufrida durante un procedimiento médico, como cirugías. Los efectos perjudiciales de tal lesión en la función de un tejido diana (p. ej., músculo diana) pueden tratarse eficazmente mediante la administración de un inhibidor de miostatina descrito en este documento. Por ejemplo, tal administración puede prevenir y/o aliviar la miopatía y/o facilitar la recuperación.

[0197] Cuando se pretende de este modo, el resultado clínico del tratamiento de la miopatía es principalmente para promover el crecimiento muscular (hipertrofia), los pacientes se pueden administrar con un inhibidor de miostatina, tal como los descritos en el presente documento, en un principio como una monoterapia. Se debe controlar la respuesta a la terapia para detectar efectos clínicos. Si no se obtienen beneficios significativos de la monoterapia dentro de un periodo de tiempo razonable, por ejemplo, entre 1 y 6 meses después de iniciar la terapia de inhibición de la miostatina, la suplementación con un estimulador anabólico se puede considerar como una terapia de combinación.

[0198] Alternativamente, los pacientes de la miopatía con un fondo catabólico, es probable que requieran impulso anabólico concurrente para efectuar efectos completos de inhibición de miostatina para alcanzar el crecimiento muscular significativo y por lo tanto se consideran candidatos para una terapia de combinación. Estas poblaciones de pacientes incluyen, pero no se limitan a: aquellos que son ancianos (p. ej., 65 años o más), aquellos que presentan síntomas clínicos de sarcopenia, aquellos que presentan síntomas clínicos de caquexia, aquellos que presentan síntomas de osteoporosis, aquellos que padecen infecciones frecuentes o crónicas, aquellos con condiciones que causan la inmunodeficiencia en general, aquellos con lesiones graves o la enfermedad que causa inmovilidad prolongada, etc.

[0199] De acuerdo con ello, descritas en este documento son las terapias de combinación que incluyen un inhibidor de miostatina y un anabólico estimulador. Dichas terapias de combinación pueden ser ventajosas para el tratamiento de cualquier condición en la que el paciente se beneficie de una función motora y/o metabólica mejorada pero cuyas capacidades anabólicas se vean comprometidas.

[0200] Regímenes terapéuticos dirigidos a lograr tanto la inhibición de miostatina como la estimulación anabólica pueden ser particularmente ventajosos para las poblaciones de edad avanzada. Por lo tanto, la presente divulgación abarca terapias de combinación que incorporan tanto un inhibidor de la señalización de miostatina como un agente que potencia o favorece las rutas anabólicas, por ejemplo, un estimulador anabólico. Por ejemplo, tales terapias de combinación pueden ser útiles para tratar afecciones musculares relacionadas con la edad, como la sarcopenia. Esto se basa en la observación de que, como parte del proceso de envejecimiento normal, las actividades anabólicas se pierden gradualmente, como lo demuestra la disminución de la síntesis de proteínas, el metabolismo más lento, etc., y con este telón de fondo, la inhibición de la miostatina puede ser menos efectiva para ejercer sus efectos de mejora muscular. De manera similar, tales terapias de combinación pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones, tales como caquexia, miositis por cuerpos de inclusión esporádica (SIBM) y atrofia muscular relacionada con el desuso. Se

contempla que en presencia de un agente que restaure o refuerce las actividades de la maquinaria anabólica celular, se puedan lograr completamente los efectos de mejora muscular de la inhibición de la miostatina. Esto puede explicar, al menos en parte, por qué tantos inhibidores de la miostatina en la clínica hasta la fecha han mostrado un éxito limitado en el logro de resultados clínicamente significativos. Estos estudios generalmente involucraron a pacientes mayores, cuyas capacidades anabólicas probablemente se debilitaron debido a la edad u otras condiciones que conducen el equilibrio preferentemente hacia un estado catabólico sobre un estado anabólico. Este reconocimiento arroja luz sobre la selección de poblaciones de pacientes apropiadas que probablemente respondan a las terapias con inhibidores de miostatina, y la presente invención abarca dicho reconocimiento.

[0201] Como se usa en el presente documento, agentes que aumentan las vías anabólicas celulares incluyen cualquiera de los agentes que estimulan o favorecen proteína síntesis sobre la descomposición de proteínas y pueden ser denominados colectivamente en este documento como "estimulador anabólico." Por lo general, la estimulación anabólica en un tejido/órgano puede provocar hipertrofia como resultado de la síntesis de proteínas neta positiva sobre la degradación de proteínas en el tejido/órgano. Por el contrario, cuando las vías catabólicas dominan sobre las vías anabólicas, el resultado neto puede incluir atrofia del tejido/órgano debido a que se favorece la degradación de proteínas sobre la síntesis de proteínas. Por lo tanto, el resultado neto es probablemente un equilibrio entre estos brazos opuestos de señalización in vivo.

[0202] Muchos estimuladores anabólicos son conocidos en la técnica. Estos incluyen, sin limitación: agonistas de IGF1, hormonas anabólicas, testosterona, esteroides (p. ej., andrógenos, oximetolona, estrógenos, progestágenos, etc), GH/somatotropina, hormona paratiloide (PTH), prostaglandinas, leptina, estatina y cualquier derivado de los mismos. Cualquier agente que promueva o estimule la síntesis de proteínas y/o generalmente aumente la tasa de metabolismo puede funcionar como un estimulador anabólico.

[0203] Estimuladores anabólicos se pueden administrar a pacientes que son respondedores, respondedores pobres, o pacientes que no responden de una terapia de inhibidor de miostatina. Para los que responden mal o no responden, la estimulación concurrente de las vías anabólicas puede mejorar la capacidad anabólica del sujeto, permitiendo así que el inhibidor de miostatina se beneficie de una función motora y/o metabólica mejorada.

[0204] Aunque respondedores deficientes y/o no respondedores de inhibidores de miostatina pueden, no obstante, beneficiarse de la estimulación anabólica, una población alternativa de pacientes incluye personas que son respondedores de un inhibidor de miostatina. En el documento se contempla que la función motora en estos individuos puede mejorarse adicionalmente mediante la terapia de inhibición de miostatina usada en combinación con la terapia de estimulador anabólico.

Terapias para prevenir la atrofia muscular

[0205] Se describen en este documento métodos adecuados para prevenir la pérdida de músculo (atrofia). La prevención de la atrofia muscular puede ser deseable en una amplia gama de poblaciones de pacientes, incluidos aquellos que generalmente gozan de buena salud. Esto es útil en cualquier situación en la que el resultado clínico previsto incluya la prevención de la pérdida de masa muscular. Esto se basa, al menos en parte, en la noción del papel más amplio de la miostatina como "interruptor metabólico" para controlar la homeostasis muscular al detectar el gasto energético del cuerpo (como los niveles de glucosa) al favorecer la degradación muscular y/o la síntesis de grasas. Las terapias de inhibición de miostatina descritas en el presente documento pueden emplearse para contrarrestar esta acción.

[0206] Los pacientes adecuados para una terapia de inhibición de miostatina, por tanto, incluyen aquellos que sufren de diversos trastornos genéticos, condiciones musculares, trastornos metabólicos, lesiones, etc. Las lesiones pueden incluir, pero no se limitan a: lesiones o daños a los músculos, los huesos, los tendones, y nervios. Los pacientes con lesiones o enfermedades graves que provocan una inmovilidad prolongada también pueden beneficiarse de las terapias de inhibición de la miostatina.

[0207] En la presente memoria se describen métodos adecuados para prevenir la atrofia muscular. La atrofia muscular es un proceso catabólico altamente regulado que ocurre durante periodos de desuso (p. ej., atrofia por desuso) y/o en respuesta a una lesión o inflamación sistémica elevada (p. ej., caquexia). La atrofia muscular puede implicar una amplia gama de afecciones clínicas, incluidas afecciones sistémicas como la lesión de la médula espinal, así como afecciones más localizadas como paresia/parálisis de las cuerdas vocales. Como se usa en este documento, el término "paresia/parálisis de las cuerdas vocales" se refiere a una condición que resulta de una entrada nerviosa anormal en los músculos de la laringe (músculos laríngeos). La parálisis puede implicar la interrupción total del impulso nervioso, lo que resulta en la ausencia de movimiento; la paresia puede implicar la interrupción parcial del impulso nervioso, lo que da como resultado un movimiento débil o anormal de los músculos laríngeos. En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo anti-miostatina, o su fragmento de unión a antígeno, se administra localmente, por ejemplo, mediante inyección local directa en el músculo o músculos de las cuerdas vocales afectados.

[0208] En algunas realizaciones de la divulgación, los métodos descritos aquí son adecuados para tratar o prevenir afecciones y trastornos musculares, incluyendo atrofia muscular paraespinal (PMA). En una realización, los

anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en este documento se usan en métodos de tratamiento de una atrofia del músculo paraespinal que es una atrofia del músculo paraespinal posoperatoria, es decir, una atrofia del músculo paraespinal después de una cirugía. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen el tratamiento de una atrofia muscular dependiente de una lesión nerviosa. En una realización, los métodos de tratamiento como se describen en el presente documento incluyen el tratamiento de una atrofia muscular posoperatoria dependiente de una lesión nerviosa. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen tratar una atrofia muscular posoperatoria, en la que la cirugía es una cirugía de columna. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen el tratamiento de una atrofia muscular posoperatoria, en la que la cirugía de columna es una cirugía de columna lumbar o un procedimiento de columna lumbar, por ejemplo, un procedimiento de fusión lumbar, un procedimiento de no fusión lumbar, un procedimiento de fusión lumbar posterior, un procedimiento de fusión lumbar anterior, un procedimiento de descompresión lumbar posterior mínimamente invasivo (MIS), un procedimiento de fusión lumbar posterior mínimamente invasivo (MIS), un procedimiento no equivalente a MIS, etc. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen tratar una atrofia del músculo paraespinal después de un procedimiento de fusión de la columna lumbar. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen tratar una atrofia del músculo paraespinal después de un procedimiento de fusión de la columna lumbar posterior. En una realización, los métodos de tratamiento incluyen tratar una atrofia del músculo paraespinal después de un procedimiento de fusión lumbar no MIS. En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz facilita o acelera la recuperación de una afección, como lesiones, cirugías y otros procedimientos médicos. Estas condiciones adecuadas pueden implicar una condición que esté asociada con un daño nervioso (ya sea como resultado de una lesión o de un procedimiento quirúrgico u otro procedimiento clínico).

[0209] 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.

[0210] Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad muscular o condición relacionada con distrofias musculares. Distrofias musculares ejemplares incluyen, sin limitación, distrofias musculares de Duchenne, Becker, facioescapulohumeral (FSH) y de Limb-Girdle.

[0211] Otro aspecto de la descripción incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición relacionada uroginecológica, trastornos de glotis (estenosis), miopatía extraocular, túnel carpiano, síndrome de Guillain-Barre, o de osteosarcoma.

Aspectos de la divulgación incluyen los siguientes:

[0212] La presente divulgación proporciona un inhibidor de miostatina para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto que está en una terapia correctora SMN o se espera que sea en una terapia de corrector SMN.

[0213] En algunas realizaciones de la invención descrita anteriormente, el sujeto tiene SMA no ambulatorio. En una realización específica, el SMA no ambulatorio es SMA tipo I, tipo II o tipo III. En una realización, el sujeto tiene SMA no ambulatorio de tipo III.

[0214] En cualquiera de estas realizaciones descritas en el presente documento, el sujeto puede tener una puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de línea base de ≤ 65 . En una realización específica, el sujeto tiene una puntuación de la escala de motor funcional de Hammersmith ampliada de referencia de ≤ 60 , ≤ 55 , ≤ 50 , ≤ 45 , ≤ 40 , ≤ 35 , ≤ 30 , ≤ 25 o ≤ 20 . En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un inhibidor de miostatina para su uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto que está en terapia correctora de SMN o se espera que esté en una terapia correctora de SMN, en la que el sujeto tiene una puntuación corregida en la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de ≤ 60 , ≤ 55 , ≤ 50 , ≤ 45 , ≤ 40 , ≤ 35 , ≤ 30 , ≤ 25 o ≤ 20 , después de recibir la terapia correctora de SMN. En determinadas realizaciones de la invención a las que se hace referencia anteriormente, el sujeto tiene la puntuación corregida de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada que ha mejorado al menos en un punto con respecto a la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de referencia, después de recibir la terapia correctora de SMN. En una realización, la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de la línea base se determina antes de la administración de un inhibidor de miostatina al sujeto. En una realización, la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de línea base se determina antes de la administración de un corrector de SMN al sujeto. En una realización, la puntuación de la escala de motor funcional ampliada de Hammersmith de línea base se determina antes de la administración de un inhibidor de miostatina y un corrector de SMN al sujeto. En algunas otras realizaciones de la invención a las que se hace referencia anteriormente, el sujeto no ha mejorado la puntuación corregida de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada, después de recibir la terapia correctora de SMN.

[0215] En cualquiera de estas formas de realización descritas en el presente documento, la terapia correctora de SMN comprende: a) un modificador de empalme; b) un reemplazo del gen SMN o terapia génica; c) un potenciador de la

transcripción SMN; d) un potenciador de la traducción de proteínas SMN; o e) un estabilizador de proteínas SMN. En una realización particular, el corrector SMN es un corrector central o un corrector sistémico. El término corrector central, como se usa en este documento, se refiere a un corrector de SMN que se administra directamente al SNC por vía intratecal. El término corrector central, como se usa en este documento, se refiere a un corrector de SMN que se administra sistémicamente (p. ej., administración oral) y afecta no sólo al SNC sino también a otros tejidos. En una realización diferente, el modificador de empalme de (a) es un modificador de empalme basado en ARN. En una realización particular descrita en el presente documento, el modificador de empalme de (a) se administra al sujeto por vía intratecal (es decir, se administra en el canal espinal o en el espacio subaracnoideo para que llegue al líquido cefalorraquídeo (LCR). En una realización diferente, en donde la terapia correctora de SMN comprende un reemplazo del gen SMN o una terapia génica de (b) que se administra con un vector, en donde el vector es opcionalmente un vector viral. Los términos "vector" y "vector viral" tendrán su significado ordinario y ser evidente para una persona experta en las técnicas bioquímicas.

[0217] En una realización, el modificador de empalme de (a) descrito anteriormente es un modificador de empalme de molécula pequeña. En una realización particular, el modificador de empalme de molécula pequeña se administra por vía oral (es decir, la administración donde se toma una sustancia a través de la boca). En una realización específica, el modificador de empalme de moléculas pequeñas se administra dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, o una vez a la semana.

[0218] La divulgación también proporciona un inhibidor de miostatina para su uso en el tratamiento de SMA en un sujeto que tiene SMA ambulatorio y que no está en una terapia correctora de SMN. El SMA ambulatorio puede ser de tipo III o IV de tipo ambulatorio. El sujeto puede tener una puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de referencia de ≥ 40 , ≥ 45 , ≥ 50 o ≥ 55 . En una realización diferente de la divulgación descrita anteriormente, el sujeto tiene una puntuación de Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de referencia que varía entre 48 y 58, inclusive.

[0219] La divulgación también proporciona un inhibidor de miostatina para su uso en el tratamiento de la SMA en un sujeto que ha sido identificado como un portador de una mutación SMN y que no está en una terapia correctora SMN. El término "portador de una mutación SMN" tendrá su significado corriente y, en este contexto, se referirá a una persona u otro organismo que ha heredado el alelo SMN recesivo (es decir, no dominante) pero que no muestra ese rasgo o muestra síntomas de la enfermedad causada por el alelo dominante SMN. El sujeto puede identificarse como portador mediante exploración genética en el útero (es decir, dentro del útero) o como un bebé.

[0220] En una realización de la descripción, un inhibidor de la miostatina es para uso en el aumento de la masa muscular en un sujeto, en donde i) un músculo diana está en estado anabólico; y/o, ii) el sujeto es tratado con un estimulador anabólico.

[0221] En una realización adicional de la descripción anterior, los sujetos padecen sarcopenia, caquexia, infecciones, inmovilidad prolongada, o el sujeto es ≥ 65 años de edad.

[0222] En el presente documento se describe un inhibidor de miostatina para su uso en la prevención de la pérdida de músculo en un sujeto, en donde el sujeto padece una afección que comprende daño parcial a la función neuromuscular, y en donde el sujeto está en terapia neuronal para tratar o mejorar las neuronas motoras. La afección puede ser un trastorno genético que afecta la función neuronal o una lesión.

[0223] El inhibidor de miostatina para uso de acuerdo con la invención comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, que se une: i) miostatina pro o latente; o ii) miostatina madura. En una realización adicional de la invención descrita anteriormente, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une a la miostatina pro/latente pero no se une a una miostatina madura o GDF11. En una realización diferente de la invención descrita anteriormente, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une a una miostatina madura pero no se une a una GDF11 maduro. En otra realización de la invención descrita anteriormente, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se administra al sujeto en una dosis que varía entre 1 mg/kg y 30 mg/kg. En una realización diferente de la invención descrita anteriormente, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se administra al sujeto dos veces por semana, una vez a la semana, cada dos semanas o una vez al mes. En cualquiera de las realizaciones anteriores que describen el inhibidor de miostatina, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se administra al sujeto por vía intravenosa (es decir, inyectada en una vena) o subcutánea (es decir, inyectada en la piel).

[0224] En una realización de la descripción, el inhibidor de la miostatina es un antagonista de moléculas pequeñas de miostatina o un antagonista biológico de la miostatina. Según la invención, el antagonista biológico de la miostatina es un anticuerpo, o una parte del mismo que se une a un antígeno.

[0225] En el presente documento se describe un método para tratar una afección muscular en un sujeto humano, el método comprende un paso de: seleccionar un sujeto humano que tiene un músculo diana que tiene capacidades anabólicas intactas, en donde la señalización neuromuscular funcional entre el músculo diana y una inervación de la motoneurona está parcialmente deteriorada, y la administración al sujeto humano de un inhibidor de miostatina en una

cantidad eficaz para mejorar la función del músculo diana, tratando así la afección muscular en el sujeto humano. En una realización de la divulgación, el músculo diana ha retenido o recuperado al menos una inervación parcial de la neurona motora. En una realización, el músculo diana comprende fibras de tipo II de contracción rápida. En una realización, el sujeto humano es un sujeto pediátrico.

[0226] En una realización de la divulgación, el método comprende además administrar un estimulador anabólico al sujeto. En una realización, el estimulador anabólico se administra al sujeto antes de la administración del inhibidor de miostatina, al mismo tiempo que la administración del inhibidor de miostatina, o después de la administración del inhibidor de miostatina. En una forma de realización, la afección muscular está asociada con un defecto en la neurona motora. En una realización, el defecto es un defecto genético. En una realización, el defecto genético es una mutación en *Smn1*.

[0227] En una realización de la divulgación, el método comprende además administrar un agente que corrige el defecto genético al sujeto humano. En una realización, el agente es un modulador de empalme. En una realización, el agente es un agente de molécula pequeña o un agente de ácido nucleico. En una realización, el agente aumenta la función de la neurona motora. En una realización, la función de la neurona motora incluye excitabilidad de la membrana, transporte axonal, tráfico de vesículas, liberación de neurotransmisores, función mitocondrial y/o disponibilidad mitocondrial. En una realización, el agente es un corrector SMN.

[0228] En una realización de la divulgación, la afección muscular está asociada con una enfermedad neuromuscular. En una realización, la enfermedad neuromuscular es atrofia muscular espinal (SMA). En una realización, el SMA es SMA de tipo I, SMA de tipo II o SMA de tipo III. En una realización, la SMA de tipo III es SMA ambulatorio o SMA no ambulatorio.

[0229] Cualquiera de los inhibidores de la miostatina se describe en el presente documento pueden formularse en una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de miostatina y, opcionalmente, un excipiente. Dichas composiciones farmacéuticas se usan para el tratamiento de una enfermedad o afección en sujetos humanos como monoterapia o terapia de combinación de acuerdo con la presente divulgación.

[0230] La divulgación abarca el uso de cualquier inhibidor de miostatina descrito aquí para la fabricación de un medicamento adecuado para la administración en sujetos humanos, de acuerdo con la presente descripción.

[0231] Esta invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no debe interpretarse como limitante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: SRK-015: Inhibición específica de activación de miostatina

[0232] Al igual que otros miembros de la familia TGF β , la miostatina se secreta como un precursor inactivo, denominado proMiostatina, en donde la presencia de prodominio ocluye el acceso al factor de crecimiento a su receptor. La activación de la miostatina resulta de dos etapas distintas de escisión proteolítica (Figura 1). La proMiostatina se escinde primero por una proteasa convertasa, como la furina, que reconoce un sitio RXXR entre el prodominio y el factor de crecimiento maduro (30, 62). Después de la escisión, el factor de crecimiento y el prodominio permanecen asociados, formando un complejo latente (miostatina latente) que no puede unirse a su receptor. El factor de crecimiento activo se libera después de una segunda escisión por un miembro de la familia BMP/tolloide (como TLL-2; proteína 2 similar a tolloide) (63). Después de la activación, la miostatina se une a un complejo de receptores que consta de un receptor de tipo I (Alk4/5) y un receptor de tipo II (ActRIIA/B), lo que da como resultado la fosforilación y activación de Smad2/3. La activación de esta vía de señalización conduce en última instancia a una reducción en la síntesis de proteínas y una mejora de la degradación de proteínas (64). La miostatina se ha detectado en dos compartimentos in vivo: en la circulación donde predomina la forma latente, y en el músculo principalmente como proMiostatina, que se asocia con proteínas de la matriz extracelular como el perlecano (65-68).

[0233] Un enfoque novedoso ha sido tomado para descubrir y desarrollar inhibidores de la miostatina con un mecanismo único de acción y especificidad muy mejorada sobre la mayor parte de otros inhibidores. Como se describió anteriormente, las formas maduras miostatina y GDF11 son idénticas en un 90%, lo que dificulta la identificación de anticuerpos que son específicos de miostatina. Sin embargo, los prodominios de estos factores de crecimiento son solo un 43% idénticos. Por lo tanto, nos hemos dirigido a las formas precursoras de la miostatina y generamos anticuerpos que se unen específicamente e inhiben la activación de la miostatina madura a partir de la forma latente.

[0234] El anticuerpo SRK-015P ("P" para *parental*) se optimizó para generar SRK-015, un anticuerpo monoclonal completamente humano. SRK-015 se diferencia de su clon parental en cinco residuos en el dominio variable fuera de la región que determina la complementariedad. Ambos anticuerpos se unen a la miostatina latente y latente con alta afinidad (como un rango nanomolar de un solo dígito, p. ej., 2-9 nM), mientras que no tienen unión detectable a ninguna forma de GDF11 o Activina A, ni a BMP9, BMP10, o TGFB1. Cuando se incubó con proMiostatina (expresada y purificada internamente a partir de un sistema de expresión de mamífero), furina y proteasas mTLL-2, SRK-015 inhibió

la liberación de miostatina madura, medida por la activación de la expresión de luciferasa en una línea celular reportera Smad2/3. SRK-015 no tuvo efecto en un ensayo de actividad de proteasa similar usando proGDF11 como sustrato, demostrando nuevamente la especificidad de SRK-015 por pro y miostatina latente. SRK-015 no inhibió la capacidad de la miostatina madura para señalizar en este ensayo. Tanto SRK-015 como SRK-015P tenían una actividad funcional similar hacia la proMiostatina humana y de ratón en el ensayo indicador, de modo que los valores de CE50 para los dos anticuerpos en el ensayo de activación de proMiostatina usando proMiostatina humana y de ratón son similares. Los fragmentos de proteína producidos después de la escisión de la miostatina latente con mTLL-2 se analizaron para demostrar que SRK-015 inhibía la segunda etapa de proteólisis (mediada por tolloide) necesaria para la activación de la miostatina. Se ha demostrado la capacidad de SRK-015 para unirse al prodominio de miostatina e inhibir la escisión de tolloides. Se incubó miostatina latente recombinante purificada con TLL-2 tolloide proteasa en presencia de concentraciones crecientes de SRK-015. Las muestras se separaron reduciendo SDS-PAGE y se sondaron mediante transferencia Western con un anticuerpo que reconoce el prodominio de miostatina. La generación dependiente de proteasa del fragmento de escisión se inhibió con cantidades crecientes del anticuerpo, lo que indica que la unión de SRK-015 a la miostatina latente inhibió la segunda etapa de escisión mediada por tolloide.

Ejemplo 2: Localización in situ de pro-formas de miostatina

[0235] Como SRK-015 se une a miostatina pro y latente, se investigó la localización de estas pro-formas en el músculo esquelético de ratón para asegurar que estas formas de miostatina están presentes en el espacio extracelular del músculo donde pueden unirse e inhibirse por el anticuerpo SRK-015. Las criosecciones de los músculos tibiales anteriores de ratones sanos se inmunotefñieron con el anticuerpo GDF8_068, que se une a la miostatina pro latente y no al factor de crecimiento maduro. Los tejidos también fueron inmunotefñidos con anticuerpos contra laminina, un componente de la matriz extracelular del músculo. Los resultados mostraron que la mayoría de los precursores de miostatina detectados en el músculo están en el espacio extracelular con poca señal detectada intracelularmente. Se produjo una tinción conjunta significativa en los espacios extracelulares intersticiales y alrededor de los núcleos intersticiales. Para asegurar la especificidad de la tinción del anticuerpo, las muestras se inmunotefñieron con GDF8-068 que se había preincubado con un exceso molar de 100 veces de proMiostatina o proGDF11 purificada. La preincubación con proMyostatin abolió completamente la señal, mientras que la preincubación con pro-GDF11 no tuvo ningún efecto sobre la tinción. Estos datos indican que la miostatina pro latente y latente están presentes en el espacio extracelular en el músculo esquelético y, por lo tanto, pueden unirse e inhibirse por SRK-015.

Ejemplo 3: SRK-015 previene la atrofia muscular inducida por dexametasona

[0236] SRK-015 aumentó la masa muscular en animales sanos y redujo la pérdida de músculo en un modelo de atrofia inducida por dexametasona. Como se muestra en la Figura 2, la administración de una dosis única de 20 mg/kg de SRK-015 a ratones machos sanos (grupo vehículo) dio como resultado un aumento significativo de la masa muscular (17,5% frente al control de IgG) después de 15 días. También se observaron aumentos similares en la masa muscular en ratones hembra (datos no mostrados). SRK-015 también fue eficaz para prevenir la pérdida de masa muscular con el tratamiento con dexametasona. La administración crónica de dexametasona resultó en una pérdida significativa de masa muscular el día 8 (disminución del 16%, vehículo IgG frente a IgG Dex). Una única administración de 20 mg/kg de SRK-015 a ratones tratados con dexametasona previno la atrofia muscular durante el transcurso del estudio, sin que se observara una diferencia significativa entre los grupos de control de vehículo de IgG y tratados (Figura 2).

Ejemplo 4: SRK-015P mejora el peso muscular y la función en animales sanos

[0237] Además de aumentar la masa muscular, el tratamiento con SRK-015 dio lugar a ganancias en la función muscular. Para evaluar los efectos funcionales mediados por SRK-015, se usó una versión murinizada de SRK-015P (muSRK-015P), en la que las regiones constantes de IgG4 humana se reemplazaron por las de IgG1 de ratón para limitar las respuestas inmunitarias al anticuerpo durante un estudio de cuatro semanas. Los tres anticuerpos, muSRK-015, muSRK-015P y SRK-015, se unen a proMiostatina murina con afinidades similares (Kd de 2,57 nM, 2,88 nM y 8,35 nM, respectivamente). Se trataron ratones C57BL/6 sanos de 10 semanas de edad con vehículo (PBS) o 20 mg/kg de muSRK-015P semanalmente durante cuatro semanas. Después del tratamiento, se examinó *in vivo* la función evocada por los nervios del grupo de músculos flexores plantares (músculos de gastrocnemio, sóleo y plantar) en un rango de activación fisiológicamente relevante. Los animales tratados mostraron un aumento del 19% en la generación de par isométrico a frecuencias superiores a 60 Hz (P = 0,003) (FIG. 3A). Se observó un aumento del 31% en la tasa máxima de contracción, sin alteraciones en la respuesta fuerza-frecuencia (datos no mostrados). Para confirmar los efectos directos de la inhibición de la miostatina en el músculo, independientemente de la función nerviosa y el suministro de sangre, se midió la fuerza *in vitro* de los músculos EDL aislados. La evaluación *in vitro* de la generación de fuerza EDL demostró aumentos similares en la función, con un aumento del 24% a 80 Hz (P = 0,024), 28% a 100 Hz (P = 0,010) y 27% a 150 Hz (P = 0,011) (FIG. 3B). No se observaron alteraciones en las tasas de contracción y relajación o de las relaciones de frecuencia de fuerza con la EDL después del tratamiento (datos no mostrados). Como era de esperar, cuatro semanas de tratamiento con muSRK-015P también afectaron la masa muscular, con un aumento del gastrocnemio en un 22% (P = 0,009; FIG. 3C) y la EDL en un 34% (P = 0,007; FIG. 3D). Cuando la fuerza se normalizó al peso del músculo, no hubo diferencia entre el vehículo y los grupos tratados para los músculos gastrocnemio o EDL, lo que indica que la hipertrofia inducida por el tratamiento con muSRK-015P no afectó negativamente la calidad muscular o la excitabilidad (datos no mostrados). El análisis histológico del grupo

de flexor plantar demostró un aumento del 27% en el área de la sección transversal total ($P = 0,019$, datos no mostrados), el resultado de un aumento del 29% en el área de la sección transversal de las fibras musculares de Tipo IIB ($P = 0,009$; FIG. 3E). No hubo ningún cambio en el área de la sección transversal de las fibras Tipo I, IIA o IIX, ni hubo un cambio en la distribución del tipo de fibra después del tratamiento (datos no mostrados).

5 *Ejemplo 5: Inhibición de la miostatina mejora la función muscular en ratones SMA tratados con corrector de empalme*

10 **[0238]** Para evaluar la capacidad de SRK-015 para mejorar la función muscular en SMA, una variante de un modelo farmacológico de SMA en donde la gravedad de la enfermedad puede ser moderada mediante la administración de cantidades variables del modulador de empalme SMN2 de molécula pequeña SMN-C1 se utilizó (17, 26). La base de este modelo es el modelo de ratón $\Delta 7$ de SMA severo. Este ratón, que carece del único gen SMN murino endógeno, expresa dos copias de SMN2 humano así como dos copias de SMN que carecen del exón 7 (*Smn*^{-/-}; *hSMN2*; *SMN Δ 7*). Debido a la gravedad de la enfermedad en este modelo, la mediana de supervivencia de este ratón es de 13 días, que es una cantidad de tiempo insuficiente para evaluar la eficacia de los posibles agentes terapéuticos (70). Al administrar una dosis baja (0,1 mg/kg/día) de SMN-C1 desde el nacimiento a los ratones $\Delta 7$, la supervivencia se extiende de tal manera que el 70% de los ratones tratados sobreviven hasta el día posnatal (DPN) 52, aunque la gravedad de la enfermedad sigue siendo alta. El tratamiento con una dosis alta de SMN-C1, 3 mg/kg/día, da como resultado una forma leve de SMA, y los ratones parecen en gran parte sanos y muestran solo déficits modestos en el peso y la función corporales. Un modelo intermedio de gravedad se puede lograr mediante la administración de ratones $\Delta 7$ con 0,1 mg/kg/día de SMN-C1 para los primeros 24 días después del nacimiento, seguido por un cambio a 3 mg/kg/día a partir de entonces (bajo-alto tratamiento). En términos de peso corporal y función muscular, el fenotipo de estos ratones tratados de baja-alta se encuentra aproximadamente a medio camino entre el fenotipo de dosis baja y alta (17, 26, 71). El paradigma de SMN-C1 bajo-alto también es útil para evaluar el potencial terapéutico de los tratamientos en combinación con moduladores de empalme SMN2, ya que imita a los pacientes con SMA grave que, una vez diagnosticados, comienzan el tratamiento con un corrector de empalme (es decir, nusinersen) meses o años después del nacimiento. El inicio del tratamiento con una segunda terapia concurrente con una dosis alta de SMN-C1 permite determinar el efecto de la terapia de combinación.

30 **[0239]** A fin de evaluar la eficacia de la inhibición de la activación de la miostatina en combinación con corrección de empalme SMN2, a ratones $\Delta 7$ en un régimen SMN-C1 bajo-alto se les administraron vehículo o dosis semanales de 20 mg/kg muSRK-015P, a partir de las PND24, concurrente con el cambio a dosis altas de SMN-C1. Los ratones se trataron durante 4 semanas adicionales con 3 mg/kg/día de SMN-C1 y muSRK-015P o vehículo. Se incluyeron ratones de tipo salvaje no tratados como control. Al final del estudio, se evaluaron los pesos musculares, el área de la sección transversal de las fibras y la función nerviosa evocada del grupo de músculos flexores plantar y masetero. En el ratón $\Delta 7$, el masetero es un músculo gravemente afectado, mientras que el gastrocnemio está relativamente a salvo (7).

40 **[0240]** Mientras que muSRK-015P no mejoró la función de masetero, el tratamiento muSRK-015P resultó en un aumento significativo al 60% en la generación de par de torsión máximo por el grupo de músculos flexor plantar (FIG. 4A, FIG. 4B). Curiosamente, no se observaron aumentos significativos en la masa del músculo gastrocnemio o en el área de sección transversal media del grupo del flexor plantar (FIG. 5A, FIG. 5B). Sin embargo, se observó un cambio en la distribución de frecuencia del área de la sección transversal de las miofibras, en donde los animales tratados con muSRK-015P tienen más miofibras entre 1000-2000 μm^2 , mientras que los ratones tratados con vehículo tienen un mayor número de miofibras menores de 1000 μm^2 (FIG. 5C). No está claro por qué el peso muscular no aumentó con el tratamiento en este modelo mientras que la generación de fuerza aumentó significativamente. Hasta la fecha, todos los estudios en animales realizados con esta molécula han dado como resultado aumentos significativos en el peso muscular y no se han publicado informes de que la inhibición de la miostatina mejore la función muscular en ausencia de aumentos de masa. Una posibilidad es que el tratamiento con muSRK-015P pueda mejorar la salud y/o la calidad del músculo de manera que aumente la expresión de factores neurotróficos y mejore la supervivencia de las neuronas motoras. Se ha demostrado que la expresión de múltiples factores neurotróficos por el músculo (es decir, HGF, neurotrofina-4 y GDNF) apoya la supervivencia y el crecimiento de las neuronas motoras (73-75).

50 *Ejemplo 6: Beneficios de la inhibición de miostatina requiere suficiente inervación muscular*

55 **[0241]** La eficacia diferencial de muSRK-015P en el gastrocnemio (que constituye el grueso del grupo plantarflexor) y el masetero se puede atribuir a dos facetas de patología de la enfermedad de SMA. En primer lugar, se conoce y también se demuestra aquí que la inhibición de la miostatina da como resultado preferentemente la hipertrofia de las fibras musculares glucolíticas rápidas (Tipo IIB en el ratón) ((76, 77) y FIG. 3E). Mientras que el músculo gastrocnemio del ratón consiste principalmente en fibras de Tipo IIB (~ 75%), el masetero tiene significativamente menos, entre el 10 y el 25% (78, 79). En segundo lugar, como músculo gravemente afectado, la denervación del masetero es más extensa que la del gastrocnemio (7). Para ser eficaz, la inhibición de la miostatina depende de una inervación muscular suficiente; el tratamiento con inhibidores de la miostatina no tiene ningún efecto sobre el músculo por debajo del nivel de lesión en un modelo de lesión completa de la médula espinal (80). Por el contrario, se observó una preservación significativa de la masa muscular y la función por debajo del nivel de lesión en un modelo de contusión de lesión de la médula espinal utilizando muSRK-015P, en donde la denervación fue solo parcial (FIG. 6). En este estudio, una mujer C57BL/6 de 8 semanas de edad ($n = 6$ a 8) se sometió a laminectomía en el nivel torácico 9 (T9) seguida de una contusión grave de la médula espinal (65 kDyne) utilizando el dispositivo compactador Infinite Horizon. Los animales

de control simulado se sometieron a laminectomía solamente. Inmediatamente después de la lesión, se administró a los ratones vehículo (PBS), control de IgG o muSRK-015P a 40 mg/kg. Se observa que los controles de PBS e IgG se muestran equivalentes en múltiples modelos (datos no mostrados). Los tratamientos se administraron semanalmente y el estudio se terminó el día 14. (FIG. 6A) Los ratones sometidos a SCI parcial grave mostraron atrofia significativa de los músculos de las patas traseras, mientras que los animales a los que se les administró muSRK-015P estaban protegidos de esta atrofia. $P < 0,05$. (FIG. 6.B) Se realizaron pruebas de función muscular 7 y 14 días después de la LME. La fuerza de agarre de las patas traseras se evaluó utilizando un medidor de fuerza digital. Mientras que los ratones tratados con vehículo e IgG mostraron una profunda pérdida de fuerza, los ratones a los que se les administró muSRK-015P retuvieron un grado significativo de fuerza en las extremidades por debajo del nivel de la lesión. $P < 0,001$. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la comparación post-hoc de Tukey.

[0242] De modo importante, los pacientes de SMA tratados con nusinersen han mostrado mejoras en amplitudes de potencial de la acción muscular del compuesto (CMAP). Esta medida normalmente solo disminuiría en estos pacientes, lo que indica que, con la modulación de empalme de SMN2, se mantiene suficiente inervación muscular, en al menos algunos músculos, para que la inhibición de la miostatina sea efectiva (25).

[0243] Los resultados preclínicos, en particular los efectos pronunciados de muSRK-015P sobre la mejora de la función muscular en dos modelos de denervación parcial (SMA y lesión de la médula espinal incompleta), el apoyo proporcionado para el potencial de SRK-015 para restaurar significativamente la función muscular para pacientes con SMA. El tratamiento con SRK-015 puede combinarse con correctores de empalme o como monoterapia en pacientes con formas más leves de enfermedad (es decir, SMA de tipo III) donde queda suficiente inervación.

Ejemplo 7: Dirección diana en ratones SMNΔ7

[0244] Ratones SMNΔ7 fueron tratados con 0,1 mg/kg/día SMN-C1, un modulador de empalme SMN, desde el nacimiento hasta el día postnatal (PND) 24. En PND24 los ratones se cambiaron a una dosis alta de SMN-C1 (3 mg/kg/día) y se inició el tratamiento con vehículo o 20 mg/kg/semana de muSRK-015P. Se administraron anticuerpos a los ratones semanalmente durante cuatro semanas. Al finalizar el estudio, se recogieron suero y músculos TA y se analizaron para determinar la dirección de la diana mediante transferencia de Western fluorescente. En estos análisis se utilizaron muestras de 3-5 animales por grupo.

[0245] La dirección diana se observó en ratones SMNΔ7 tratados con muSRK-015P. La unión a muSRK-015P resulta en la acumulación de la miostatina latente cuando la diana unida asume la vida media del anticuerpo y se acumula en la circulación y en los tejidos diana. Desarrollamos un ensayo de transferencia Western en donde se usa un anticuerpo contra el dominio pro de miostatina para evaluar los niveles de miostatina latente en suero y músculo después de la administración de anticuerpos. Hemos determinado previamente la especificidad del anticuerpo utilizando muestras de animales knockout para miostatina. Como se indicó, la dosificación de anticuerpos comenzó en el día 24 postnatal simultáneamente con un cambio de dosis baja a dosis alta del corrector SMN-C1. Después de cuatro semanas de dosificación, se recogió suero y músculo tibial anterior y se evaluó la dirección diana. Como se muestra en la Figura 7, los resultados demostraron el acoplamiento de miostatina latente en la circulación (indicado por la acumulación de la diana tras la unión del anticuerpo) después de cuatro semanas de tratamiento con muSRK-015P (ver inmunotransferencias en la FIG. 7A). El carril 1 es proMiostatina purificada recombinante, que contiene una pequeña cantidad de miostatina latente. De manera similar, la FIG. 7B muestra el compromiso del objetivo en el músculo. Se observa acumulación de miostatina latente en el músculo de ratones tratados con muSRK-015P después de cuatro semanas de tratamiento, lo que indica la unión del anticuerpo. El carril 1 es miostatina pro latente recombinante. Para permitir la normalización a través de carriles, las muestras se procesaron en geles sin tinción TGX para permitir la visualización y cuantificación del contenido total de proteína del carril en la formación de imágenes UV (Figura 7C). La cuantificación de la señal de miostatina latente en el músculo muestra una acumulación de diana de 3 veces en el grupo muSRK-015P, lo que demuestra la dirección diana. La señal de miostatina latente en cada carril se normalizó al contenido de proteína total de ese carril y se comparó con la miostatina latente presente en ratones WT (FIG. 7D).

Ejemplo 8: farmacocinética y farmacodinámica de SRK-015 en ratones scid

[0246] A los ratones macho SCID se les administró una única dosis de 5 mg/kg IV de SRK-015. Se sacrificaron cohortes separadas de ratones 4 horas, 2, 8, 15, 22, 29 y 56 días después de la dosis, y se recogieron suero y músculos TA para ensayos de participación de la diana y PK. $N = 4$ u 8 por grupo. El análisis de PK de SRK-015 se muestra en la FIG. 8A. Los niveles de SRK-015 se determinaron a partir de muestras de suero tomadas en los tiempos indicados después de la dosificación. El análisis se realizó usando un ELISA anti-IgG humana. La vida media de SRK-015 en ratones scid a 5 mg/kg fue $\sim 20,3$ días.

[0247] En consecuencia, como se muestra en la FIG. 8B, la administración de una dosis única de 5 mg/kg en estos animales dio como resultado un aumento significativo de la masa magra en relación con el control de IgG. La masa magra se midió con qNMR en los puntos de tiempo indicados después de la dosificación. Además, SRK-015 muestra una acción diana extendida en suero y músculo después de una dosis única de 5 mg/kg (ver FIG. 8C). A los 56 días posteriores a la dosificación, ya no se observó la acción diana, ya que la mayoría de SRK-015 se ha eliminado en este

momento (datos no mostrados). El compromiso de la diana se evaluó analizando los niveles de miostatina latente en suero y músculo usando transferencia Western. La unión a SRK-015 da como resultado la acumulación de miostatina latente, ya que la diana unida asume la vida media del anticuerpo y se acumula en la circulación y en los tejidos diana. En este ensayo se usó un anticuerpo contra el pro-dominio de miostatina, después de determinar la especificidad del anticuerpo usando muestras de animales knockout de miostatina. El compromiso significativo de la diana ocurre dentro de los dos días en el músculo, dentro de las cuatro horas en circulación y se mantiene hasta 29 días después de la dosis. Se analizaron muestras de tres ratones de cada cohorte.

Ejemplo 9: Farmacocinética y farmacodinámica de SRK-015 en monos cynomolgus

[0248] Las propiedades de SRK-015 PK se determinaron también en monos cynomolgus. A los animales machos de dos a tres años (edad media 34 meses) se les administraron dosis semanales de 3 mg/kg o 30 mg/kg de SRK-015 durante 8 semanas. Después de la última dosis, se siguió a los animales durante cinco semanas más en ausencia de administración del fármaco. Se utilizaron muestras de este período posterior a la dosificación para calcular los parámetros farmacocinéticos. La FIG. 9A muestra las concentraciones de SRK-015 durante la semana siguiente a la primera dosis de anticuerpo. Los niveles de anticuerpos se evaluaron mediante ELISA. La FIG. 9B muestra las concentraciones de SRK-015 durante las últimas cinco semanas del estudio después de la última de las ocho dosis semanales de anticuerpos, lo que demuestra saturación a la dosis alta.

[0249] Datos farmacocinéticos obtenidos para SRK-015 en monos cynomolgus se resumen en la Tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Parámetros PK de SRK-015 en monos cynomolgus. Los parámetros se determinaron utilizando el software WinNonlin.

Dosis	T _{1/2} (hora)	T _{max} (hora)	C _{max} (ng/ml)	AU _{Cast} (h•ng/ml)
3 mg/kg	12,4	51	243	60799
30 mg/kg	22,2	15	2648	1070638

[0250] En la terminación del estudio los animales de fueron sacrificados cinco semanas después de la última dosis como se describe anteriormente y se determinaron los pesos del músculo. Los músculos gastrocnemio y bíceps braquial (FIG. 10A y FIG. 10B, respectivamente) muestran un aumento de masa después del tratamiento con SRK-015. Los pesos de gastrocnemio aumentaron un 21% en los grupos de 3 mg/kg y un 23% en los grupos de 30 mg/kg en relación con el control del vehículo. * indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo mediante ANOVA de una vía; P <0,007. El peso del bíceps braquial aumentó un 18% en los grupos de 3 mg/kg y un 25% en el grupo de 30 mg/kg en relación con el control del vehículo. * indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo mediante ANOVA de una vía; P <0,02. Como se muestra en las FIGS. 10C y 10D, SRK-015 activó miostatina latente en ambas dosis probadas. En la FIG. 10C se muestra el transcurso de tiempo de la participación de la diana en el suero de los monos a los que se administraron 3 mg/kg o 30 mg/kg semanalmente. Las muestras de suero se recogieron en el día de estudio indicado y se analizaron mediante análisis semicuantitativo de transferencia de Western. La acumulación de miostatina latente, indicativa de la unión de SRK-015, es evidente hacia el día 8. La diana continúa acumulándose a medida que se administran dosis adicionales. Los niveles de miostatina latente se cuantificaron como se describe en el Ejemplo 7 anterior. Los efectos de SRK-015 sobre el peso muscular indican que incluso en el extremo inferior de la dosis (p. ej., 3 mg/kg/semana), SRK-015 está en o cerca del nivel de acción diana necesaria para la máxima eficacia.

Ejemplo 10: Rendimiento muscular en ratones SMNΔ7 tratados con una dosis totalmente terapéutica de SMN-C1 desde el nacimiento

[0251] A los ratones SMNΔ7 se les administró 3 mg/kg/día del modulador SMN de empalme SMN-C1 empezando en el día postnatal (PND) 1. El tratamiento con esta dosis de SMN-C1 dio como resultado una corrección significativa de la enfermedad y estaba destinado a imitar las presentaciones leves de SMA, como el SMA ambulatorio Tipo III o Tipo IV. En PND24, los ratones comenzaron el tratamiento con muSRK-015P (20 mg/kg/semana). A un grupo de control se le administró PBS. En el PND52 se evaluó la función muscular de los ratones en el grupo de músculos flexores plantares (músculos gastrocnemio, sóleo y plantar) y en el masetero. Se aislaron y pesaron músculos individuales (FIGS. 11A y 11B) después de la eutanasia. Se utilizaron como controles ratones de tipo salvaje no tratados del mismo origen genético.

[0252] El rendimiento muscular se midió usando un sistema de palanca muscular 305C (Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN) como se describe anteriormente.

[0253] Después de cuatro semanas de tratamiento con muSRK-015P, los ratones SMNΔ7 muestran un aumento de 17,7% en el peso corporal en relación con los animales de control PBS (P = 0,0021) (FIG. 11A). El tratamiento con muSRK-015P también dio como resultado un aumento de la masa de múltiples músculos de las patas traseras, incluido el gastrocnemio (aumento del 26,5%, P = 0,0071) (FIG. 11A). Este aumento de masa se reflejó en ganancias

funcionales; los ratones tratados con muSRK-015P mostraron una mejora del 22-37% en la generación de fuerza del grupo del flexor plantar en un rango de frecuencias fisiológicamente relevantes (40-80Hz) (FIG. 11B). No se observaron efectos del tratamiento con anticuerpos en el masetero, un músculo que está más afectado en este modelo que el gastrocnemio.

5

Referencias:

[0254]

- 10 1. T. Awano, J. K. Kim, U. R. Monani, Spinal muscular atrophy: journeying from bench to bedside. *Neurotherapeutics* 11, 786-795 (2014).
2. U. R. Monani, Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48, 885-896 (2005).
- 15 3. L. A. Nash, J. K. Burns, J. W. Chardon, R. Kothary, R. J. Parks, Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? *Curr Mol Med*, (2016).
4. R. Finkel, E. Bertini, F. Muntoni, E. Mercuri, E. S. W. S. Group, 209th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Clinical Trial Readiness in Spinal Muscular Atrophy 7-9 noviembre 2014, Heemskerk, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 25, 593-602 (2015).
- 20 5. S. Lefebvre et al., Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155-165 (1995).
6. U. R. Monani et al., A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8, 1177-1183 (1999).
7. K. K. Ling, R. M. Gibbs, Z. Feng, C. P. Ko, Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 21, 185-195 (2012).
- 25 8. V. Le Verche, Sunshine, S.S., Hammers, D., Sweeney, H.L., and Paushkin, S., in *Spinal Muscular Atrophy: Disease Mechanisms and Therapy*, C. J. Sumner, Paushkin, S., y Ko., C-P, Ed. (Elsevier, 2017), chap. 21, pp. 341-356. 9. V. S. Dubowitz, C.; Oldfors, A.; Lane, R., in *Muscle Biopsy, A Practical Approach*: (Elsevier, 2013), chap. 9, pp. 235-249. 10. K. J. Swoboda et al., Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol* 57, 704-712 (2005).
- 30 11. J. G. Boyer et al., Myogenic program dysregulation is contributory to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 23, 4249-4259 (2014).
12. M. Hayhurst, A. K. Wagner, M. Cerletti, A. J. Wagers, L. L. Rubin, A cell-autonomous defect in skeletal muscle satellite cells expressing low levels of survival of motor neuron protein. *Dev Biol* 368, 323-334 (2012).
- 35 13. C. Cifuentes-Diaz et al., Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152, 1107-1114 (2001).
14. C. A. Mutsaers et al., Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 20, 4334-4344 (2011).
- 40 15. M. A. Passini et al., CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 120, 1253-1264 (2010).
16. A. N. Calder, E. J. Androphy, K. J. Hodgetts, Small Molecules in Development for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Med Chem* 59, 10067-10083 (2016).
- 45 17. N. A. Naryshkin et al., Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 345, 688-693 (2014).
18. J. Palacino et al., SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. *Nat Chem Biol* 11, 511-517 (2015).
19. H. Ratni et al., Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy. *J Med Chem* 59, 6086-6100 (2016).
- 50 20. Y. Hua et al., Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 24, 1634-1644 (2010).
21. Y. Hua et al., Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478, 123-126 (2011).
- 55 22. M. A. Passini et al., Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 3, 72ra18 (2011).
23. C. A. Chiriboga et al., Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 86, 890-897 (2016).
24. R. S. Finkel et al., Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 388, 3017-3026 (2016).
- 60 25. FDA, Nusinersen; Office of drug evaluation decisional memorandum (2016).
26. Z. Feng et al., Pharmacologically induced mouse model of adult spinal muscular atrophy to evaluate effectiveness of therapeutics after disease onset. *Hum Mol Genet* 25, 964-975 (2016).
27. A. M. Glanzman et al., Validation of the Expanded Hammersmith Functional Motor Scale in spinal muscular atrophy type II and III. *J Child Neurol* 26, 1499-1507 (2011).
- 65 28. P. Kaufmann et al., Observational study of spinal muscular atrophy type 2 and 3: functional outcomes over 1 year. *Arch Neurol* 68, 779-786 (2011).

29. A. C. McPherron, A. M. Lawler, S. J. Lee, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90 (1997).
30. S. J. Lee, A. C. McPherron, Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 98, 9306-9311 (2001).
- 5 31. E. Latres et al., Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. *Skelet Muscle* 5, 34 (2015).
32. R. C. Smith et al., Myostatin Neutralization Results in Preservation of Muscle Mass and Strength in Preclinical Models of Tumor-Induced Muscle Wasting. *Mol Cancer Ther* 14, 1661-1670 (2015).
- 10 33. J. Wang, X. Wang, W. Feng, Reloading Promotes Recovery of Disuse Muscle Loss by Inhibiting TGFbeta Pathway Activation in Rats After Hind Limb Suspension. *Am J Phys Med Rehabil*, (2016).
34. X. Zhou et al., Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142, 531-543 (2010).
35. A. C. McPherron, S. J. Lee, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94, 12457-12461 (1997).
- 15 36. D. S. Mosher et al., A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 3, e79 (2007).
37. M. Schuelke et al., Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350, 2682-2688 (2004).
38. K. Garber, No longer going to waste. *Nat Biotechnol* 34, 458-461 (2016).
- 20 39. A. A. Amato et al., Treatment of sporadic inclusion body myositis with bimagrumab. *Neurology* 83, 2239-2246 (2014).
40. C. Becker et al., Myostatin antibody (LY2495655) in older weak fallers: a proof-of-concept, randomised, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3, 948-957 (2015).
- 25 41. C. Campbell et al., Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve*, (2016).
42. J. R. Mendell et al., A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 23, 192-201 (2015).
43. K. R. Wagner et al., A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 63, 561-571 (2008).
- 30 44. S. J. Lee et al., Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 102, 18117-18122 (2005).
45. A. L. Schneyer et al., Differential antagonism of activin, myostatin and growth and differentiation factor 11 by wild-type and mutant follistatin. *Endocrinology* 149, 4589-4595 (2008).
- 35 46. M. A. Egerman et al., GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab* 22, 164-174 (2015).
47. A. F. Esquela, S. J. Lee, Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev Biol* 257, 356-370 (2003).
48. D. W. Hammers et al., Supraphysiological levels of GDF11 induce striated muscle atrophy. *EMBO Mol Med*, (2017).
- 40 49. J. Kim et al., GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science* 308, 1927-1930 (2005).
50. F. S. Loffredo et al., Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 153, 828-839 (2013).
- 45 51. A. C. McPherron, A. M. Lawler, S. J. Lee, Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet* 22, 260-264 (1999).
52. H. H. Wu et al., Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron* 37, 197-207 (2003).
53. M. Sinha et al., Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 344, 649-652 (2014).
- 50 54. R. Wijayarathna, D. M. de Kretser, Activins in reproductive biology and beyond. *Hum Reprod Update* 22, (2016).
55. E. Lach-Trifilieff et al., An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy. *Mol Cell Biol* 34, 606-618 (2014).
56. K. T. Murphy et al., Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J* 24, 4433-4442 (2010).
57. B. C. Yaden et al., Follistatin: a novel therapeutic for the improvement of muscle regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 349, 355-371 (2014).
58. P. Singh, H. Rong, T. Gordi, J. Bosley, I. Bhattacharya, Translational Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of MYO-029 Antibody for Muscular Dystrophy. *Clin Transl Sci* 9, 302-310 (2016).
- 60 59. L. Woodhouse et al., A Phase 2 Randomized Study Investigating the Efficacy and Safety of Myostatin Antibody LY2495655 versus Placebo in Patients Undergoing Elective Total Hip Arthroplasty. *J Frailty Aging* 5, 62-70 (2016).
60. P. Balagopal, O. E. Rooyackers, D. B. Adey, P. A. Ades, K. S. Nair, Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol* 273, E790-800 (1997).
- 65 61. S. W. Lamberts, A. W. van den Beld, A. J. van der Lely, The endocrinology of aging. *Science* 278, 419-

424 (1997).

62. S. J. Lee, Extracellular Regulation of Myostatin: A Molecular Rheostat for Muscle Mass. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 10, 183-194 (2010).

63. N. M. Wolfman et al., Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 100, 15842-15846 (2003).

64. H. Q. Han, X. Zhou, W. E. Mitch, A. L. Goldberg, Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2333-2347 (2013).

65. S. B. Anderson, A. L. Goldberg, M. Whitman, Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283, 7027-7035 (2008).

66. H. R. Bergen, 3rd et al., Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay. *Skelet Muscle* 5, 21 (2015).

67. G. Sengle, R. N. Ono, T. Sasaki, L. Y. Sakai, Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* 286, 5087-5099 (2011).

68. T. A. Zimmers et al., Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296, 1486-1488 (2002).

69. J. R. Apgar et al., Beyond CDR-grafting: Structure-guided humanization of framework and CDR regions of an anti-myostatin antibody. *MAbs* 8, 1302-1318 (2016).

70. T. T. Le et al., SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 14, 845-857 (2005).

71. X. Zhao et al., Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of a small-molecule SMN2 splicing modifier in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 25, 1885-1899 (2016).

72. M. Liu, D. W. Hammers, E. R. Barton, H. L. Sweeney, Activin Receptor Type IIB Inhibition Improves Muscle Phenotype and Function in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS One* 11, e0166803 (2016).

73. H. Funakoshi et al., Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268, 1495-1499 (1995).

74. C. E. Henderson et al., GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064 (1994).

75. Y. Yamamoto et al., Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development* 124, 2903-2913 (1997).

76. J. Yang et al., Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 60, 351-361 (2001).

77. B. Zhao, R. J. Wall, J. Yang, Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 248-255 (2005).

78. V. Augusto, Padovani, C.R., and Campos, G.E.R., Skeletal muscle fiber types in C57BL/6 mice. *Braz. J. morphol. Sci* 21, 89-94 (2004).

79. J. M. Eason, G. A. Schwartz, G. K. Pavlath, A. W. English, Sexually dimorphic expression of myosin heavy chains in the adult mouse masseter. *J Appl Physiol* (1985) 89, 251-258 (2000).

80. Z. A. Graham et al., A Soluble Activin Receptor IIB Fails to Prevent Muscle Atrophy in a Mouse Model of Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 33, 1128-1135 (2016).

[0255] Las diversas características y realizaciones de la presente invención, referenciadas en las secciones individuales anteriores se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, mutatis mutandis. En consecuencia, las características especificadas en una sección pueden combinarse con las características especificadas en otras secciones, según corresponda.

[0256] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinación utilizando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Se pretende que tales equivalentes estén incluidos en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la miostatina que es selectivo para la miostatina para su uso en un método para tratar la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto,
 5 en donde el inhibidor selectivo de la miostatina debe administrarse en una cantidad eficaz para tratar la SMA, en donde el sujeto es: (i) en una terapia correctora de SMN o es tratado con una terapia correctora de SMN dentro de los seis meses posteriores al inhibidor de miostatina; y (ii) en una fase de crecimiento y/o en la necesidad de recibir una terapia a largo plazo, donde opcionalmente la terapia a largo plazo implica un manejo de por vida de SMA, en donde el inhibidor selectivo de miostatina es:
- 10 (a) un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina pro latente, inhibiendo de ese modo la activación de miostatina; o
 (b) un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina madura; y en donde la terapia correctora de SMN comprende:
- 15 i) un modificador de empalme;
 ii) un reemplazo del gen SMN o una terapia génica;
 iii) un potenciador de la transcripción SMN;
 20 iv) un potenciador de la traducción de proteínas SMN; o,
 v) un estabilizador de proteínas SMN.
2. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto pediátrico o un adulto joven que todavía está en crecimiento y es anabólicamente activo.
- 25 3. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 (a), en donde el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, se une a un prodominio de miostatina.
4. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 (a), en donde el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, no se une a la miostatina madura que no está asociada con la miostatina pro- o latente.
- 30 5. El inhibidor de miostatina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el corrector de SMN es un ARN antisentido o una molécula pequeña.
6. El inhibidor de miostatina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto tiene SMA no ambulatorio o SMA ambulatorio.
- 35 7. El inhibidor de miostatina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con SMA de tipo I, SMA de tipo II o SMA de tipo III.
- 40 8. El inhibidor de miostatina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto tiene una puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada de línea base de ≤ 65 antes de la administración del inhibidor de miostatina.
- 45 9. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad eficaz para tratar SMA es una cantidad eficaz para:
- a) retrasar o aliviar la atrofia muscular;
 b) retrasar la pérdida de neuronas motoras α ;
 50 c) prevenir o retrasar la expresión de marcadores musculares inmaduros;
 d) prevenir, aliviar o retrasar los depósitos de grasa intramuscular **caracterizados por** el reemplazo graso del tejido muscular;
 e) aumentar la puntuación de la Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada en ≥ 1 puntos en comparación con el grupo de control no tratado, o en ≥ 1 puntos con respecto al valor inicial medido antes del tratamiento;
 55 f) retrasar la disminución progresiva de una Escala de Motor Funcional de Hammersmith Ampliada durante un período de 12 meses, 24 meses o 36 meses;
 g) aumentar la puntuación de CHOP INTEND en ≥ 1 punto en comparación con el control no tratado; y/o,
 h) aumentar una puntuación de MFM-32 en al menos 1 punto en comparación con el control no tratado.
- 60 10. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor se administra mediante una inyección o infusión intravenosa o mediante una inyección subcutánea.
11. El inhibidor de miostatina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor es un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que:
- 65 (a) comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3,

CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

CDRH1 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 1 o 2;
CDRH2 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 4 o 5;
CDRH3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 10;
CDRL1 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 12 o 13;
CDRL2 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 18 o 19; y
CDRL3 comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 22;

(b) 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; o

(c) comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

12. Un inhibidor de miostatina que es selectivo para la miostatina y un corrector de SMN, para su uso en un método para tratar la atrofia muscular espinal (SMA) en un sujeto, en donde el sujeto se encuentra en una fase de crecimiento y/o necesita recibir un tratamiento a largo plazo, en el que opcionalmente la terapia a largo plazo implica el manejo de por vida de SMA, en donde el inhibidor selectivo de miostatina es:

(a) un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina pro latente, inhibiendo así la activación de miostatina; o

(b) un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a miostatina madura, y en donde el corrector SMN comprende:

- i) un modificador de empalme;
- ii) un agente de sustitución del gen SMN o un agente de terapia génica;
- iii) un potenciador de la transcripción SMN;
- iv) un potenciador de la traducción de proteínas SMN; o,
- v) un estabilizador de proteínas SMN.

13. El inhibidor de miostatina y el corrector de SMN para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el inhibidor de miostatina y el corrector de SMN son para administración simultánea o en serie al sujeto.

14. El inhibidor de miostatina y el corrector de SMN para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el sujeto recibe el corrector de SMN y el inhibidor de miostatina con un intervalo de seis meses entre sí.

15. El inhibidor de miostatina y el corrector SMN para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el sujeto es como se define en la reivindicación 2 o 6-8; en donde el inhibidor selectivo de la miostatina es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 u 11; en donde el corrector SMN es como se define en la reivindicación 5; en donde el inhibidor selectivo de la miostatina debe administrarse en una cantidad eficaz para tratar SMA como se define en la reivindicación 9; y/o en donde el inhibidor selectivo de la miostatina se administra como se define en la reivindicación 10.

Figura 1

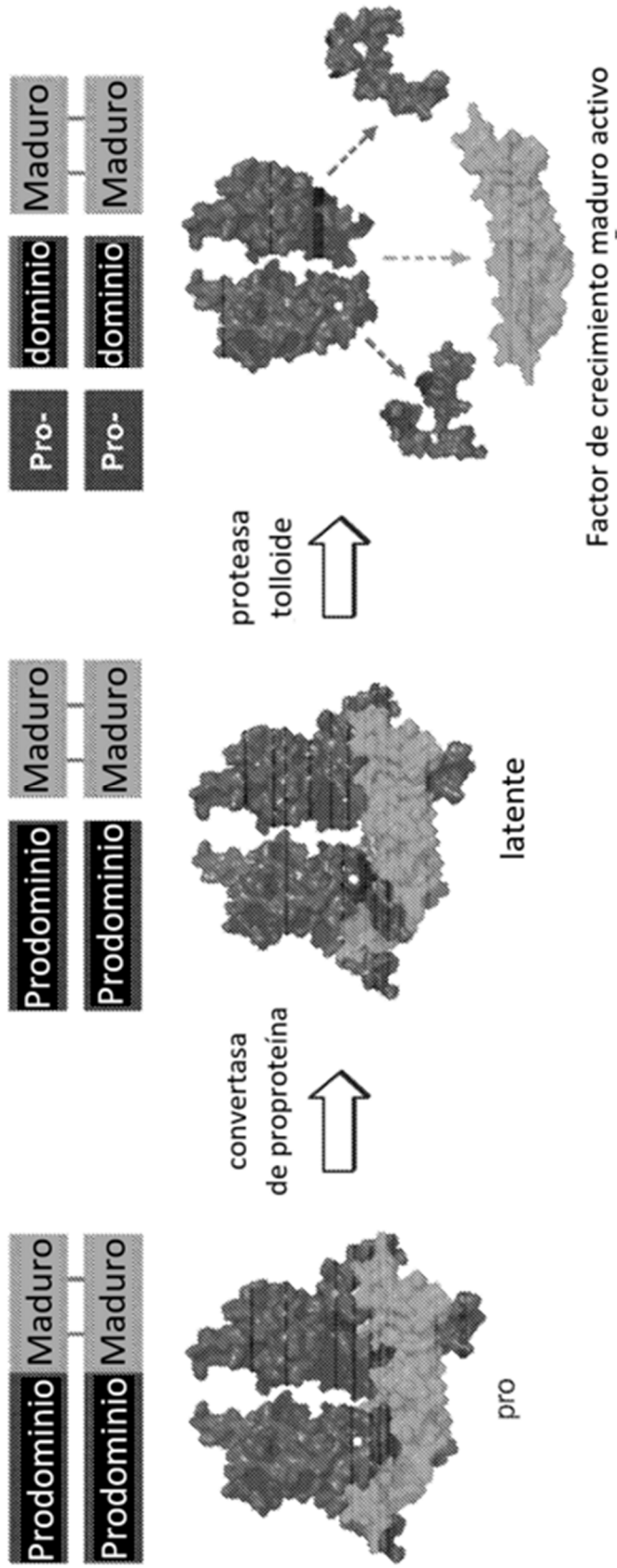


Figura 2B

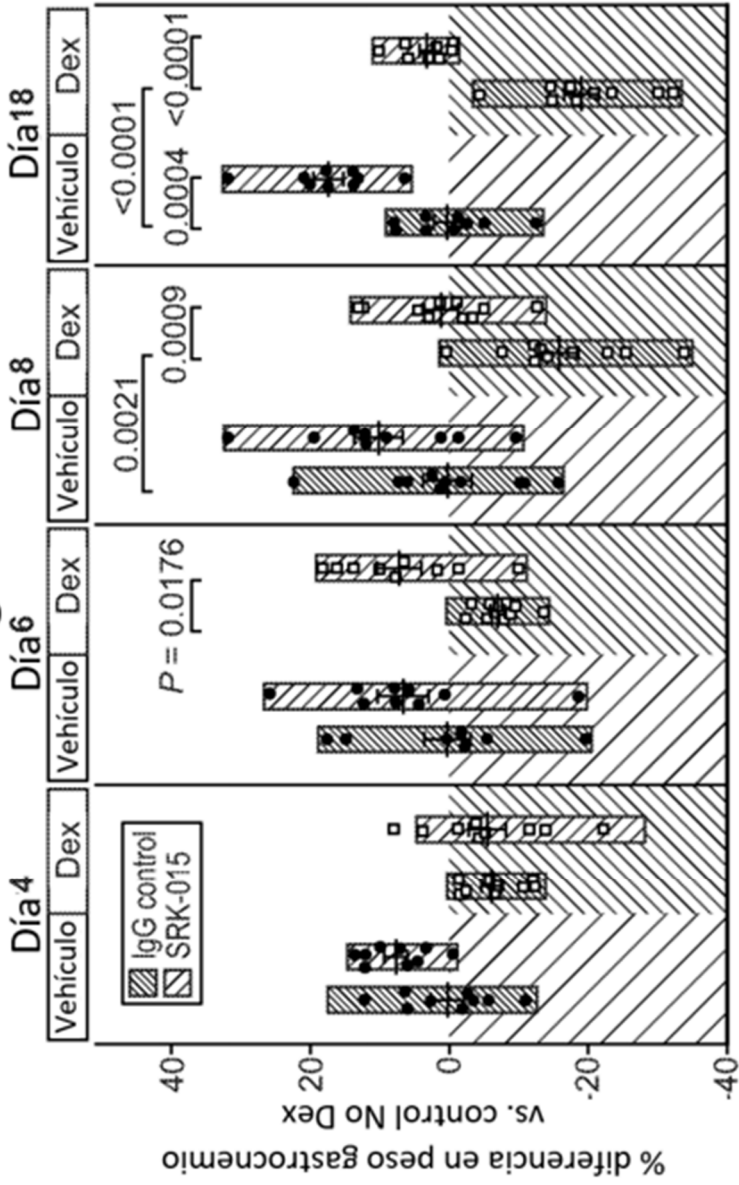


Figura 2A

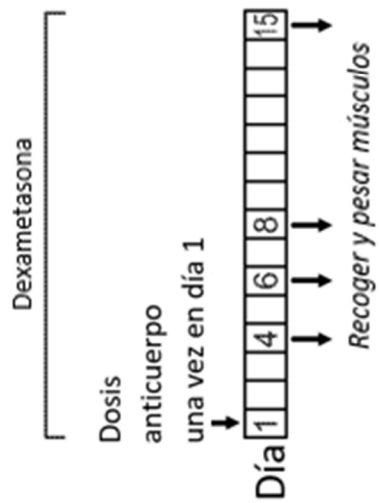


Figura 3A

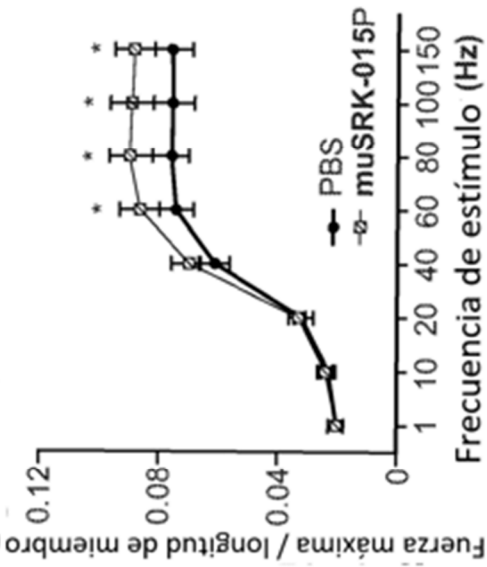


Figura 3B

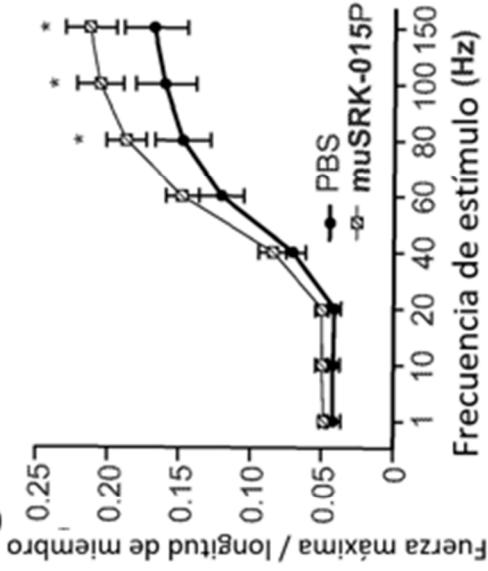


Figura 3C

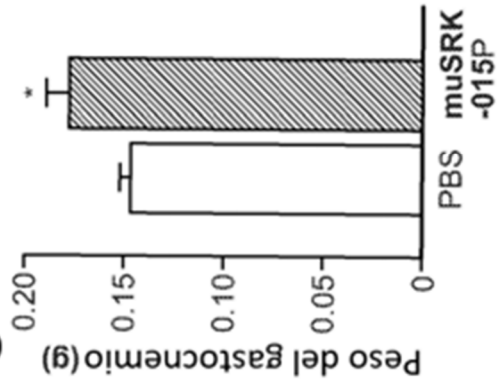


Figura 3D

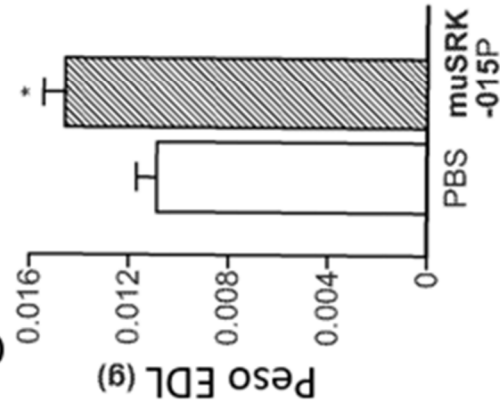


Figura 3E

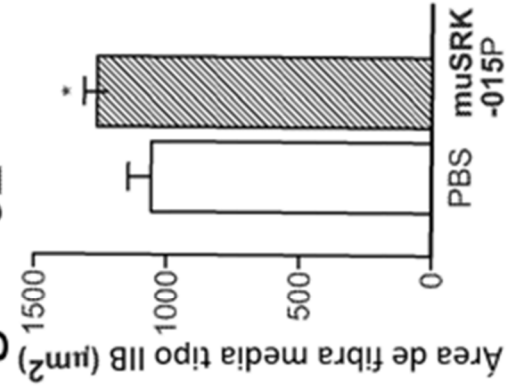


Figura 4

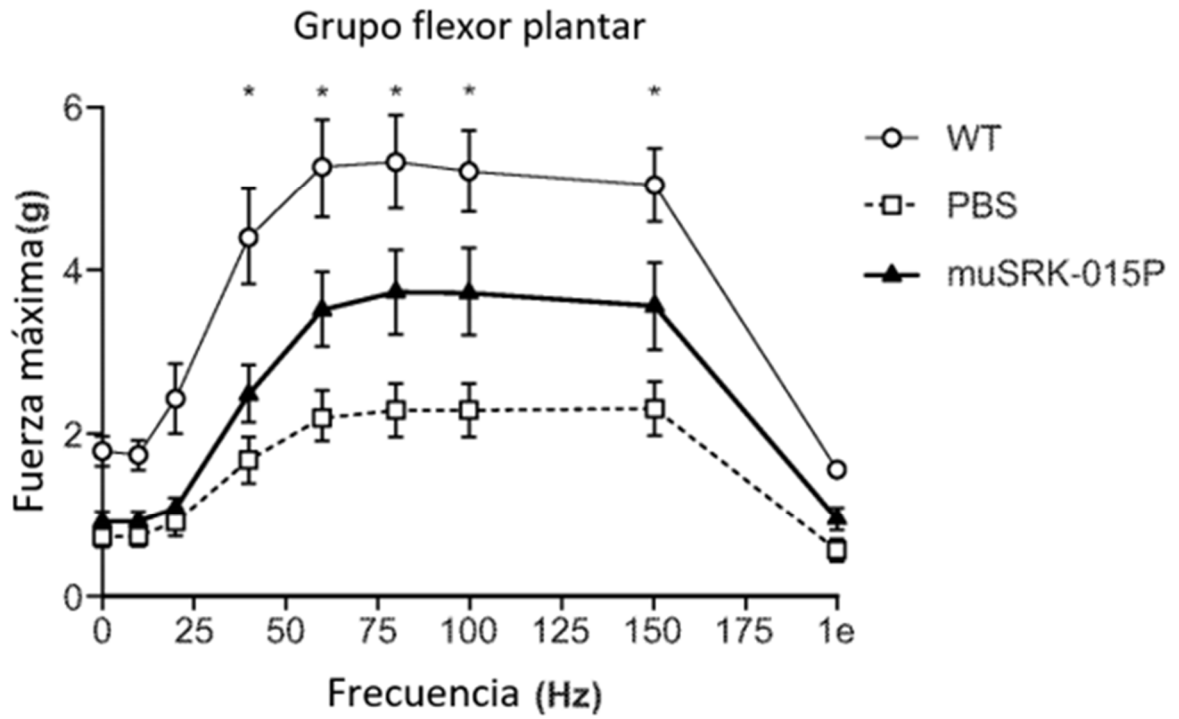


Figura 5A

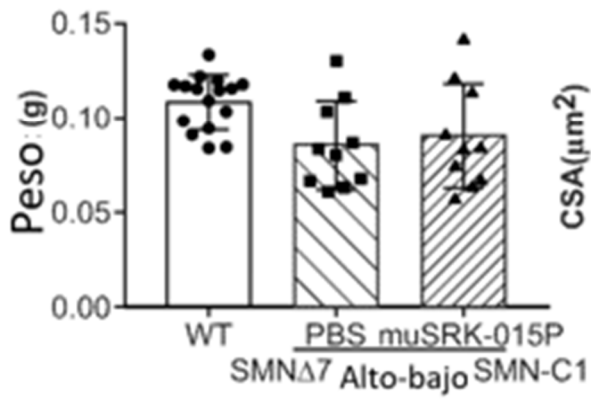


Figura 5B

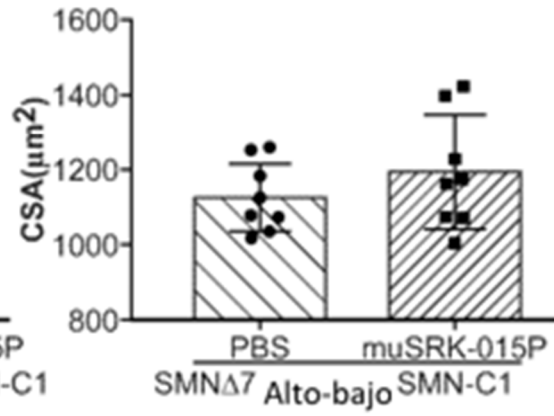


Figura 5C

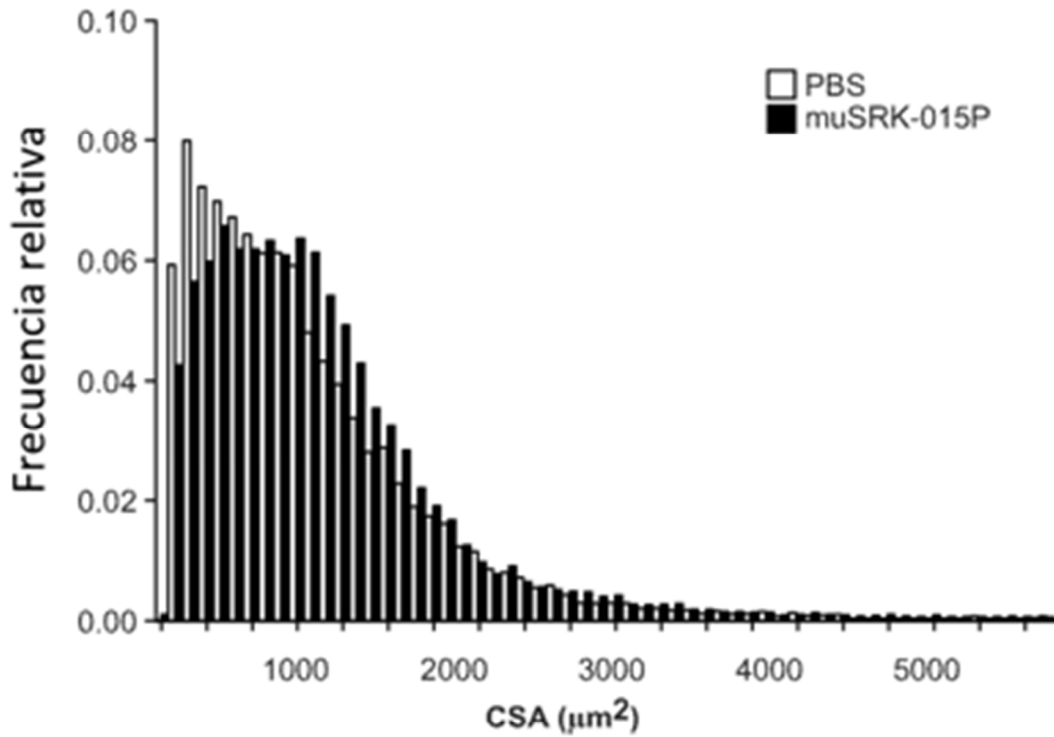


Figura 6A

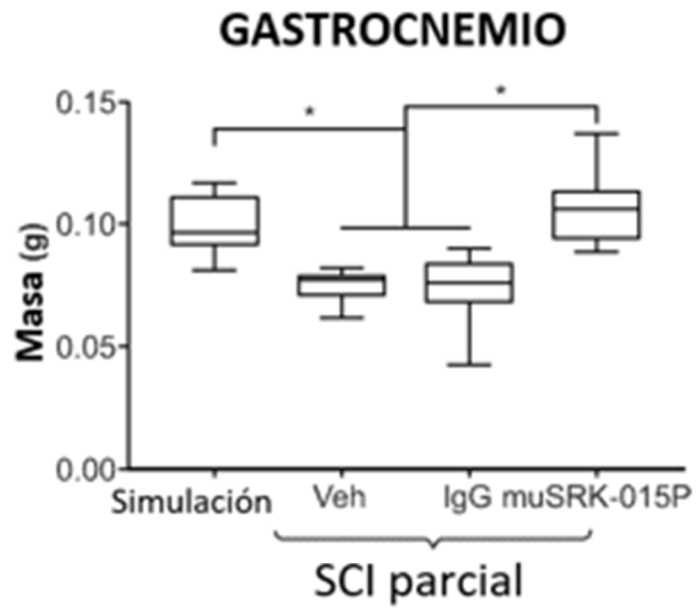


Figura 6B

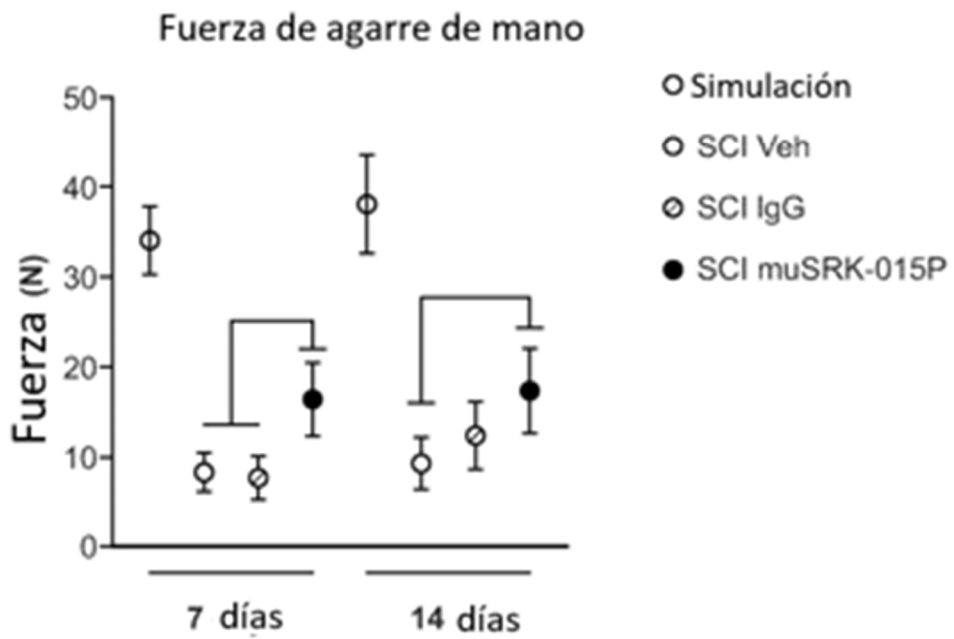


Figura 7A

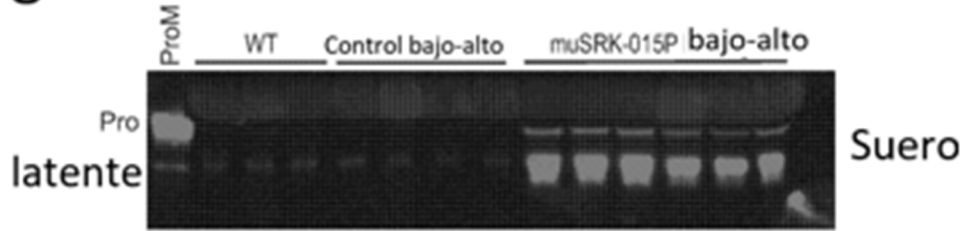


Figura 7B

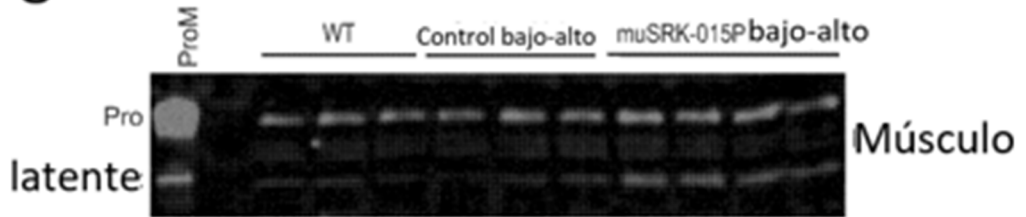


Figura 7C

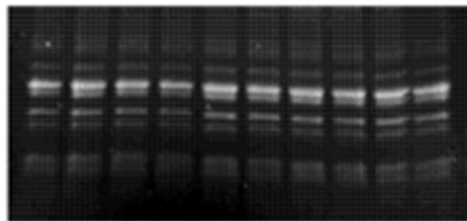


Figura 7D

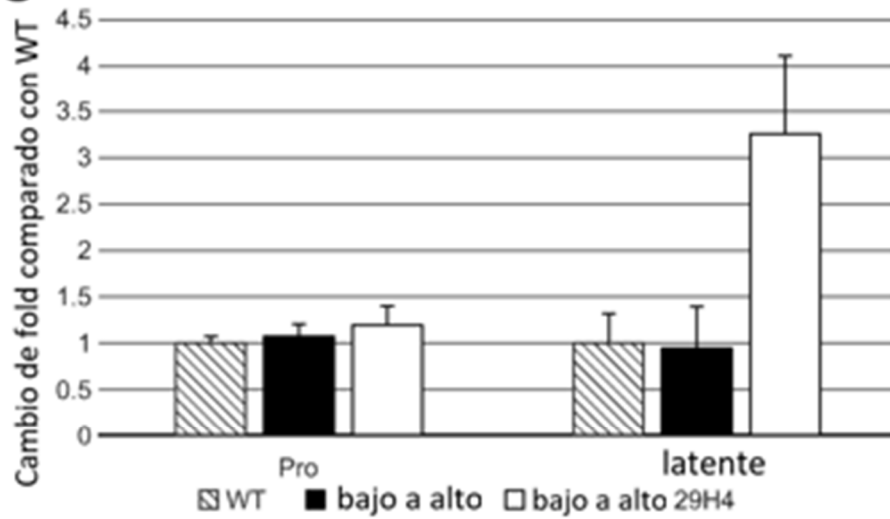


Figura 8A

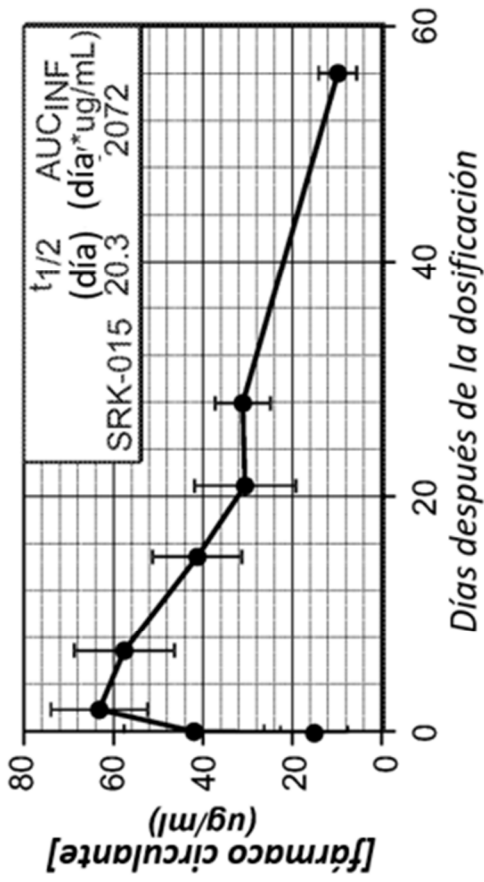


Figura 8B

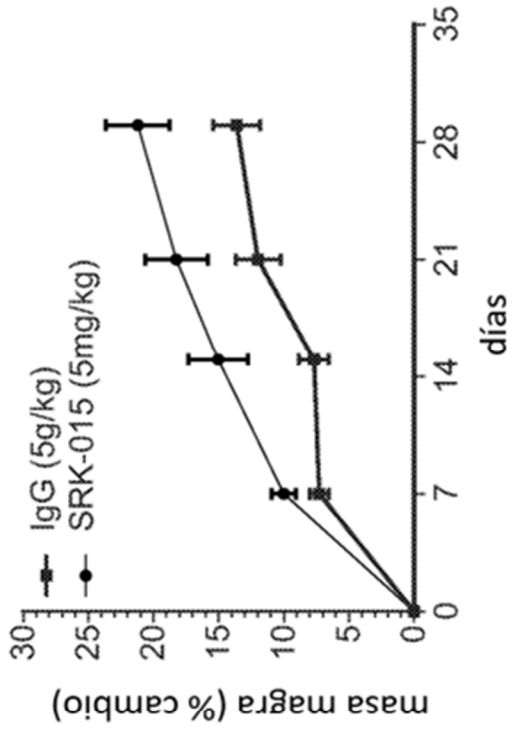


Figura 8C

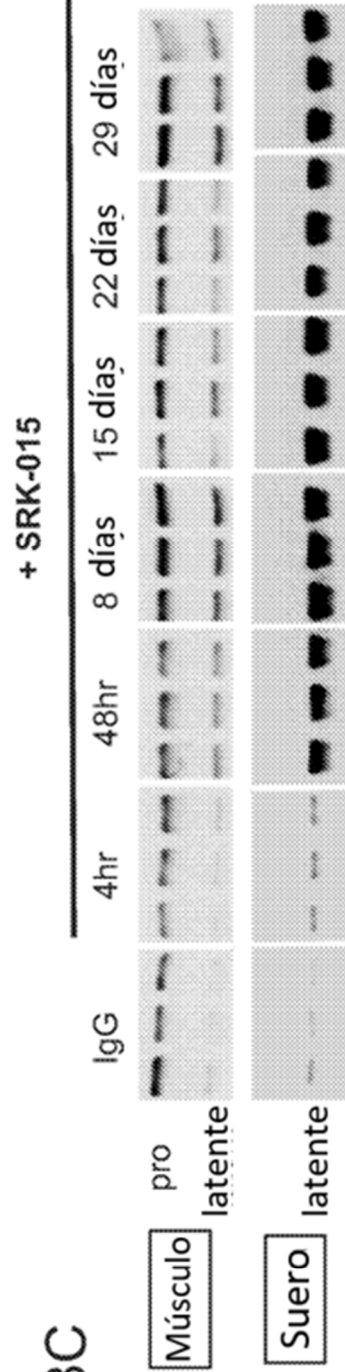


Figura 9A

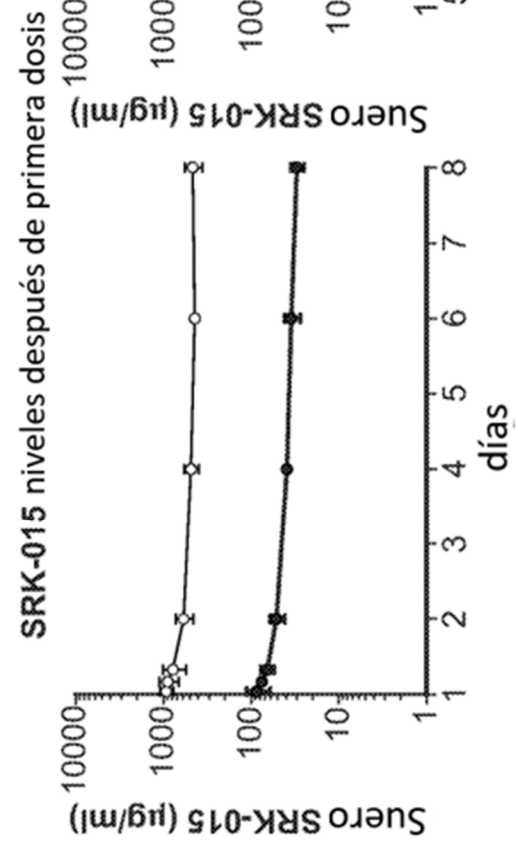


Figura 9B

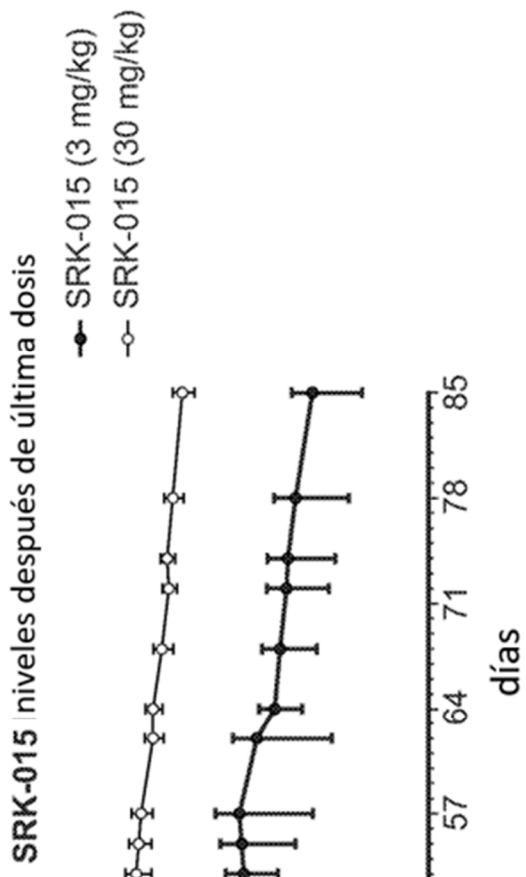


Figura 10B

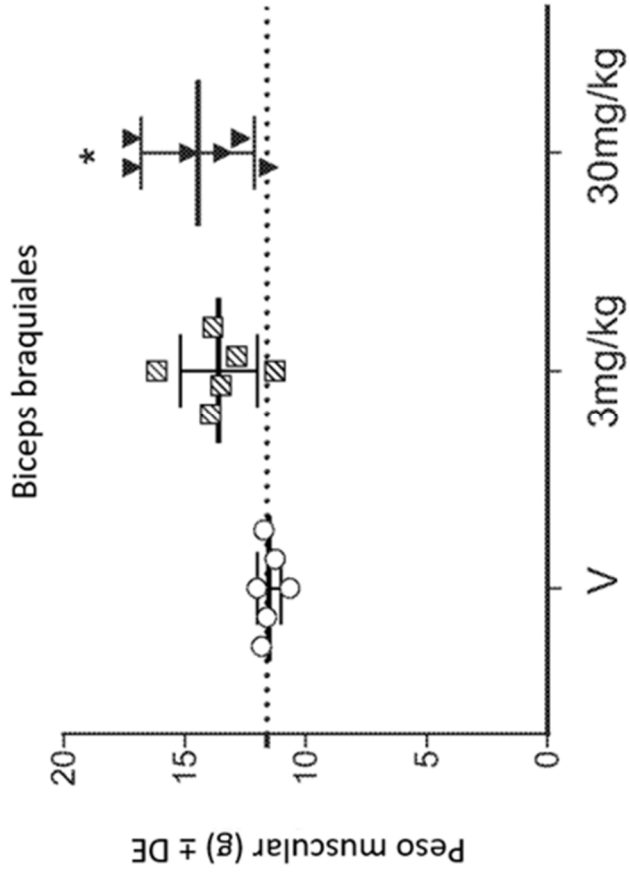
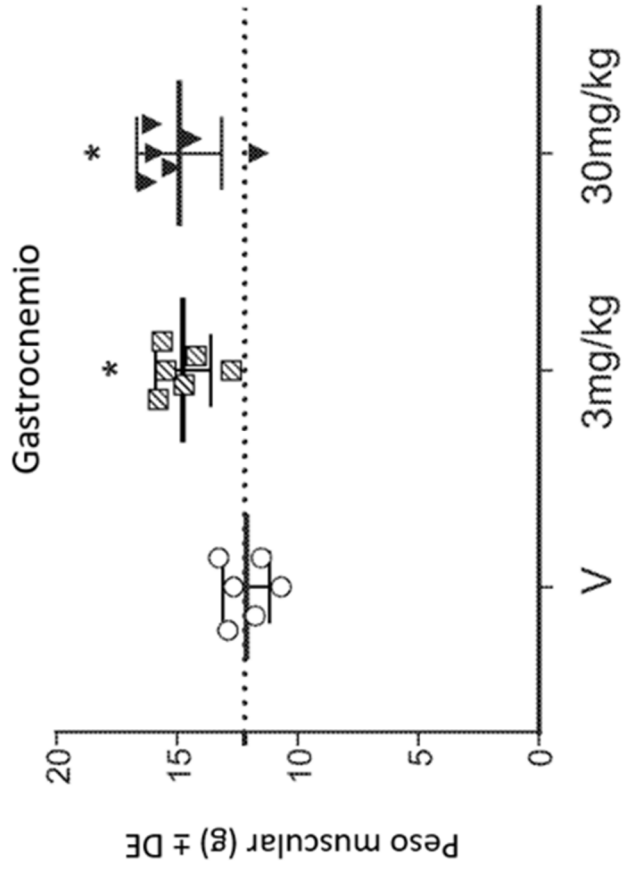


Figura 10A



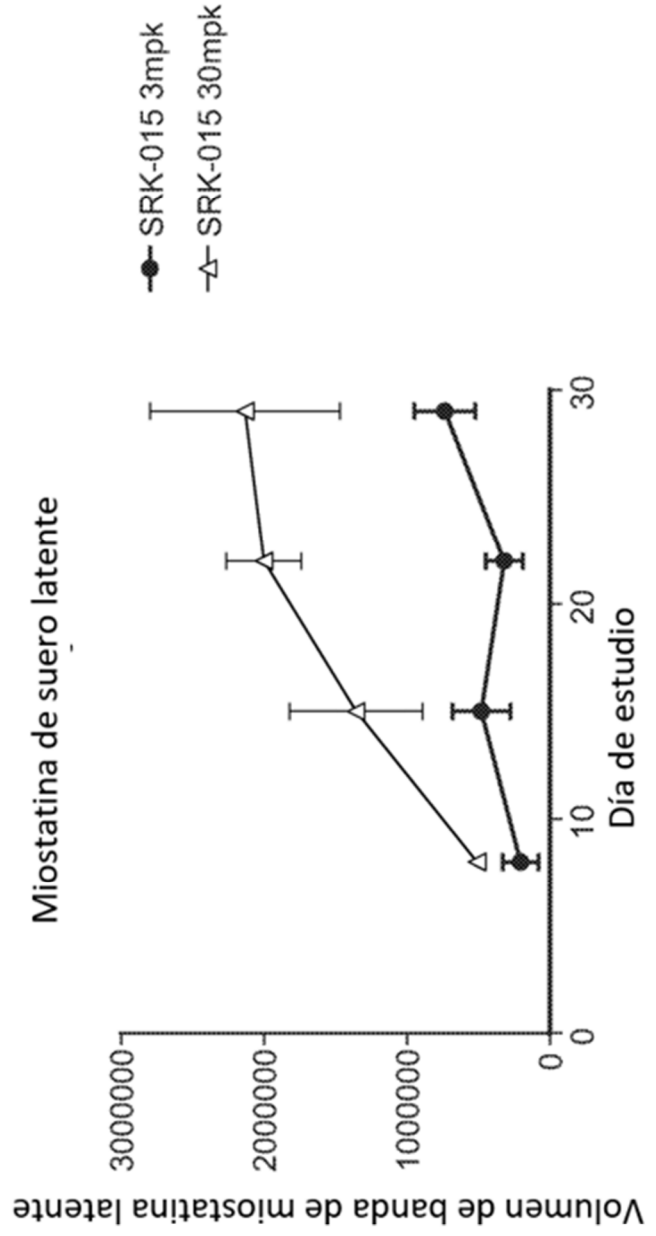
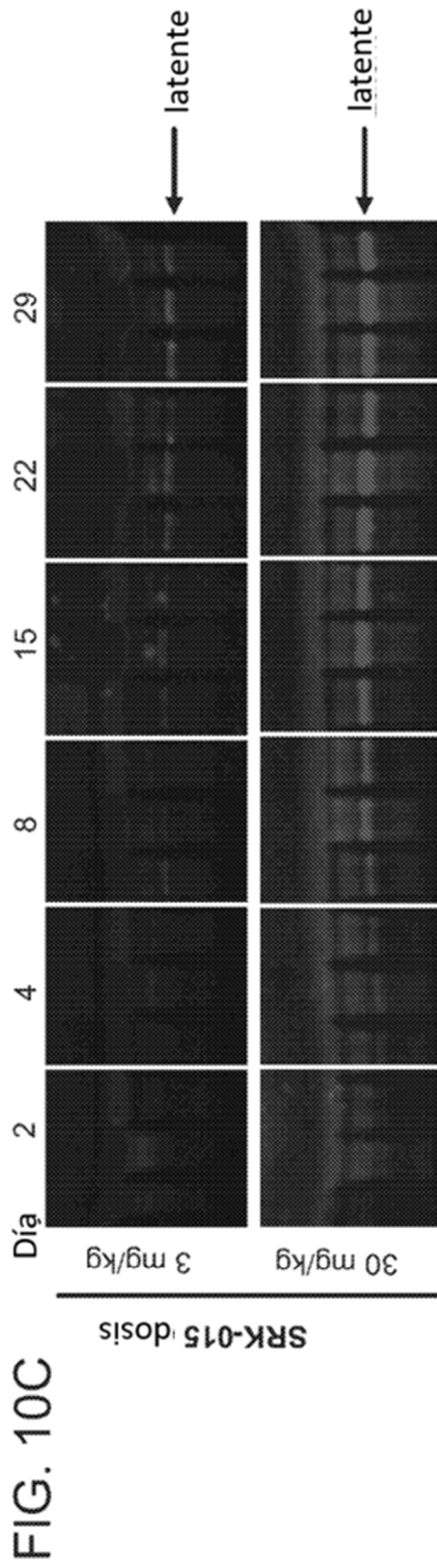


Figura 11A

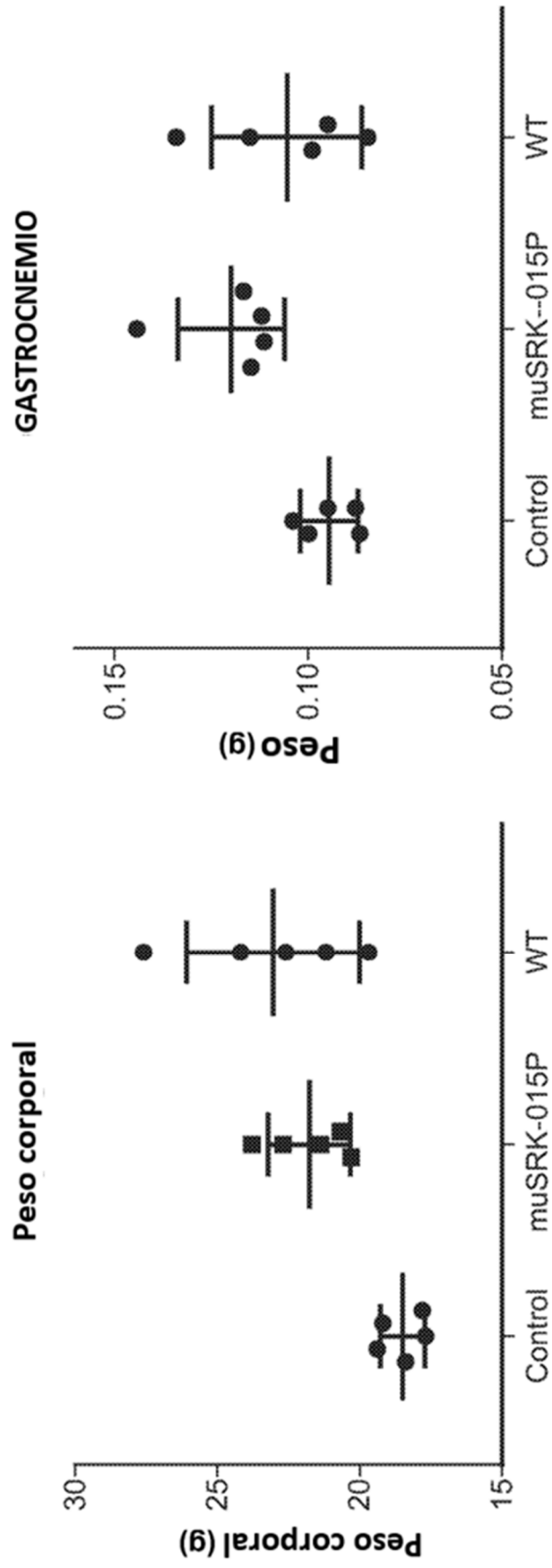


Figura 11B

