

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-537777

(P2008-537777A)

(43) 公表日 平成20年9月25日(2008.9.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
	C O 7 K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2008-503211 (P2008-503211)  
 (86) (22) 出願日 平成18年3月23日 (2006.3.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月20日 (2007.11.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/010711  
 (87) 国際公開番号 W02006/107611  
 (87) 国際公開日 平成18年10月12日 (2006.10.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/664,643  
 (32) 優先日 平成17年3月23日 (2005.3.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

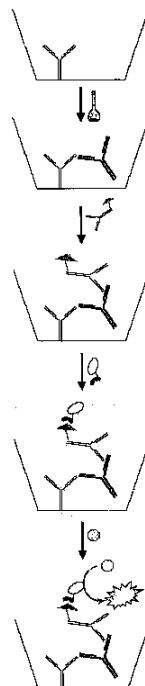
(71) 出願人 591011502  
 ワイス  
 W y e t h  
 アメリカ合衆国07940-0874ニュー  
 ジャージー州 マディソン、ファイブ・  
 ジラルダ・ファームズ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G D F - 8 調節剤に対する免疫応答の検出

(57) 【要約】

本開示は、生体サンプルにおいて、G D F - 8 調節剤、例えば、M Y O - 0 2 9 に対する抗体を検出する方法を提供する。G D F - 8 調節剤に対する免疫応答を検出する方法も含まれる。特に、ヒトを包含する動物における、G D F - 8 調節剤、例えば、G D F - 8 阻害剤に対する免疫応答を評価する方法が提供される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体サンプルにおいて G D F - 8 調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：

- ( a ) G D F - 8 調節剤を反応容器中 G D F - 8 活性についてのインビトロアッセイに添加し；
- ( b ) 生体サンプルを反応容器中 G D F - 8 活性のインビトロアッセイに添加し；
- ( c ) 生体サンプルにより G D F - 8 活性についての調節を検出し；
- ( d ) 生体サンプルの存在下での G D F - 8 活性の調節を、 G D F - 8 調節剤単独の存在下での G D F - 8 活性の調節と比較することを含む方法。

10

## 【請求項 2】

インビトロアッセイが：

- ( a ) G D F - 8 調節剤を反応容器の表面と接触させ；
- ( b ) 次に、生体サンプルを反応容器に添加し；
- ( c ) 検出剤を反応容器に添加し；
- ( d ) 表面と結合した G D F - 8 調節剤 / 抗体複合体を検出することを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

検出剤が、検出可能な標識を有する G D F - 8 調節剤である請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

検出剤が標識された G D F - 8 タンパク質である請求項 2 記載の方法。

20

## 【請求項 5】

標識がビオチンである請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

取り込まれたビオチンのモル数の薬剤のモル数に対する比が 5 : 1 未満である請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

ビオチンの薬剤に対する比が約 0 . 5 : 1 から 4 : 1 の間である請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 8】

生体サンプル中の G D F - 8 調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：

- ( a ) G D F - 8 調節剤を反応容器の表面と接触させ；
- ( b ) 生体サンプルを反応容器に添加し；
- ( c ) 検出剤を反応容器に添加し；
- ( d ) 反応容器の表面と結合する G D F - 8 調節剤 / 抗体複合体を検出することを含む方法。

30

## 【請求項 9】

検出剤が、検出可能な標識を有する工程 ( a ) の G D F - 8 調節剤である請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

検出剤が標識された G D F - 8 タンパク質である請求項 8 記載の方法。

40

## 【請求項 11】

試験サンプル中の G D F - 8 調節剤 / 標識された G D F - 8 タンパク質複合体レベルを対照サンプル中のレベルと比較することにより G D F - 8 調節剤 / 抗体複合体が検出される、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

G D F - 8 調節剤が G D F - 8 阻害剤である請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 13】

G D F - 8 阻害剤が抗体である請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

抗体が G D F - 8 と特異的に結合する請求項 13 記載の方法。

50

## 【請求項 15】

抗体が M Y O - 0 2 9 である請求項 1 4 記載の方法。

## 【請求項 16】

G D F - 8 調節剤が：

- ( a ) G D F - 8 と特異的に結合する抗体；
- ( b ) G D F - 8 結合パートナーと特異的に結合する抗体；
- ( c ) 可溶性 G D F - 8 レセプター；
- ( d ) A c t R I I B タンパク質；
- ( e ) フォリスタチンドメイン含有タンパク質；
- ( f ) フォリスタチンタンパク質；
- ( g ) G A S P - 1 タンパク質；
- ( h ) G D F - 8 タンパク質；
- ( i ) G D F - 8 プロペプチド；
- ( j ) 非タンパク質様阻害剤；
- ( k ) 核酸；および
- ( l ) 小分子から選択される請求項 8 記載の方法。

10

## 【請求項 17】

生体サンプルが、哺乳類、鳥類、は虫類、または魚類から得られる請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 18】

生体サンプルが哺乳類から得られる請求項 1 7 記載の方法。

20

## 【請求項 19】

哺乳動物がヒトである請求項 1 8 記載の方法。

## 【請求項 20】

生体サンプルが、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、涙液、胃液、滑液、および粘液から選択される請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 21】

生体サンプルが、血清、血液、および血漿から選択される請求項 2 0 記載の方法。

## 【請求項 22】

標識が、酵素、エピトープ標識、放射性標識、ビオチン、色素、蛍光タグ標識、および発光標識から選択される請求項 1 0 記載の方法。

30

## 【請求項 23】

標識がビオチンである請求項 2 2 記載の方法。

## 【請求項 24】

組み入れられたビオチンのモル数の検出剤のモル数に対する比が 5 : 1 未満である請求項 2 3 記載の方法。

## 【請求項 25】

ビオチンの薬剤に対する比が約 0 . 5 : 1 から 4 : 1 の間である請求項 2 3 記載の方法。

40

## 【請求項 26】

アビジン - 酵素複合体を添加することをさらに含む請求項 2 3 記載の方法。

## 【請求項 27】

酵素の存在下で、色、発光、または蛍光を変える基質を添加することをさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

## 【請求項 28】

生体サンプル中の G D F - 8 阻害剤と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：

- ( a ) 第一 G D F - 8 阻害剤を反応容器の表面と接触させ；
- ( b ) 生体サンプルを反応容器に添加し；
- ( c ) 標識された第二 G D F - 8 阻害剤を反応容器に添加し；

50

(d) 表面と結合した、標識された第二 G D F - 8 阻害剤を検出することを含む方法。

【請求項 29】

生体サンプルが、哺乳動物、鳥類、は虫類、または魚類から得られる請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

生体サンプルが哺乳類から得られる請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

哺乳動物がヒトである請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

生体サンプルが、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、涙液、胃液、滑液、および粘液から選択される請求項 28 記載の方法。

10

【請求項 33】

生体サンプルが、血清、血液、および血漿から選択される請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

第一 G D F - 8 阻害剤および第二の G D F - 8 阻害剤が同じである請求項 28 記載の方法。

【請求項 35】

第一 G D F - 8 阻害剤が、G D F - 8 と特異的に結合する抗体である請求項 28 記載の方法。

20

【請求項 36】

第二 G D F - 8 阻害剤が、G D F - 8 と特異的に結合する抗体である請求項 28 記載の方法。

【請求項 37】

標識が、酵素、エピトープ標識、放射標識、ビオチン、色素、蛍光タグ標識、および発光標識から選択される請求項 28 記載の方法。

【請求項 38】

標識がビオチンである請求項 28 記載の方法。

【請求項 39】

アビジン - 酵素複合体を添加することをさらに含む請求項 38 記載の方法。

30

【請求項 40】

酵素の存在下で、色、発光、または蛍光を変化させる基質を添加することをさらに含む請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

生体サンプルにおいて M Y O - 0 2 9 と特異的に結合する抗体を検出する方法であって

：

(a) 単離された M Y O - 0 2 9 を反応容器の表面と接触させ；

(b) 生体サンプルを反応容器に添加し；

(c) 標識された M Y O - 0 2 9 を反応容器に添加し；

(d) 表面に結合した、標識された M Y O - 0 2 9 を検出することを含む方法。

40

【請求項 42】

生体サンプルにおいて M Y O 特異的に結合する抗体を検出する方法であって：

(a) 反応容器中でレポーター遺伝子構造を含む宿主細胞を提供し（ここで、前記構造は G D F - 8 - 反応性制御エレメントおよびレポーター遺伝子を含む）；

(b) レポーター遺伝子の発現を活性化を調節するために十分な量の成熟 G D F - 8 タンパク質をの容器に添加し；

(c) レポーター遺伝子の G D F - 8 活性化を調節するために十分な量の M Y O - 0 2 9 を工程 (b) の容器に添加し；

(d) 生体サンプルを工程 (c) の反応容器に添加し；

(e) 生物学的サンプルの存在下および不在下でレポーター遺伝子発現を検出することを

50

含む方法。

【請求項 4 3】

生体サンプルが哺乳動物、鳥類、は虫類、または魚類から得られる請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 4】

生体サンプルが哺乳動物から得られる請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

哺乳動物がヒトである請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

生体サンプルが、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、涙液、胃液、滑液、および粘液から選択される請求項 4 1 記載の方法。

10

【請求項 4 7】

生体サンプルが血清、血液、および血漿から選択される請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

標識が、酵素、エピトープ標識、放射性標識、ビオチン、色素、蛍光タグ標識、および発光標識から選択される請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 9】

標識がビオチンである請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

取り込まれたビオチンのモル数の薬剤のモル数に対する中央比が少なくとも 5 : 1 である請求項 4 9 記載の方法。

20

【請求項 5 1】

ビオチンの薬剤に対する中央比が少なくとも 10 : 1 である請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 2】

アビジン - 酵素複合体を添加することをさらに含む請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 3】

酵素の存在下で色、発光、または蛍光を変える基質を添加することをさらに含む請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

生体サンプル中 M Y O - 0 2 9 と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：  
 ( a ) 単離された M Y O - 0 2 9 を反応容器と接触させ；  
 ( b ) 生体サンプルを反応容器に添加し；  
 ( c ) 標識された G D F - 8 を反応容器に添加し；  
 ( d ) 生体サンプルの存在下および不在下で表面と結合した、標識された G D F - 8 を添加することを含む方法。

30

【請求項 5 5】

生体サンプルが哺乳動物、鳥類、は虫類、または魚類から得られる請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

生体サンプルが哺乳動物から得られる請求項 5 5 記載の方法。

40

【請求項 5 7】

哺乳動物がヒトである請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

生体サンプルが、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、涙液、胃液、滑液、および粘液から選択される請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 9】

生体サンプルが、血清、血液、および血漿から選択される請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 6 0】

50

生体サンプルが、酵素、エピトープ標識、放射性標識、ビオチン、色素、蛍光タグ標識、および発光標識から選択される請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 6 1】

標識がビオチンである請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

アビジン - 酵素複合体を添加することをさらに含む請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

酵素の存在下および不在下で、色、発光、または蛍光を変える基質を添加することをさらに含む請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

第一 G D F - 8 阻害剤に対する個体の免疫応答を評価する方法であって：

- ( a ) 第一 G D F - 8 阻害剤を反応容器の表面と接触させ；
- ( b ) 個体からの生体サンプルを反応容器に添加し；
- ( c ) 標識された第二 G D F - 8 阻害剤を反応容器に添加し；
- ( d ) 表面と結合した、標識された第二 G D F - 8 阻害剤 / 抗体複合体を検出することを  
含み、  
標識された複合体の検出が、第一 G D F - 8 阻害剤に対する免疫応答を示す方法。

10

【請求項 6 5】

第一 G D F - 8 阻害剤に対する個体の免疫応答を評価する方法であって：

- ( a ) G D F - 8 阻害剤を反応容器の表面と接触させ；
- ( b ) 個体からの生体サンプルを反応容器に添加し；
- ( c ) 標識された G D F - 8 タンパク質を反応容器に添加し；
- ( d ) 試験サンプル中の表面と結合した、標識された G D F - 8 タンパク質の量を対照サンプルと比較することを含み、  
標識された複合体の減少したレベルの検出が、G D F - 8 阻害剤に対する免疫応答を示す方法。

20

【請求項 6 6】

第一 G D F - 8 阻害剤に対する個体の免疫応答を評価する方法であって、

- ( a ) 反応容器中にレポーター遺伝子構造を含む宿主細胞を提供し（ここで、前記構造は G D F - 8 - 反応性制御エレメントおよびレポーター遺伝子を含む）；
- ( b ) レポーター遺伝子の発現を活性化するために十分な量の成熟 G D F - 8 タンパク質を容器に添加し；
- ( c ) レポーター遺伝子の G D F - 8 活性化を調節するために十分な量の M Y O - 0 2 9 を工程（ b ）の容器に添加し；
- ( d ) 生体サンプルを工程（ c ）の反応容器に添加し；
- ( e ) 生体サンプルの存在下および不在下でレポーター遺伝子発現を検出することを含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

（関連出願）

本出願は、2 0 0 5 年 3 月 2 3 日に提出された米国仮出願番号 6 0 / 6 6 4 , 6 4 3 の利益を主張し、その内容は全体として本発明の一部として参照される。

本発明は G D F - 8 調節剤に対する免疫応答の検出に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

成長および分化因子 - 8 ( G D F - 8 ) は、ミオスタチンとも呼ばれ、構造的に関連する成長因子の形質転換成長因子 - ベータ ( T G F - ) スーパーファミリーのメンバーである。このスーパーファミリーのメンバーは、生理学的に重要な成長調節および形態形成特性を有する ( K i n g s l e y ら、G e n e s D e v . 8 : 1 3 3 - 1 4 6 ( 1 9

50

94); Hoodlessら、Curr. Topics Microbiol. Immunol. 228:235-272(1998)。同様に、これらは、分泌のための短いペプチドシグナルおよび高度に保存されたタンパク分解開裂部位により生活性カルボキシ末端部分から隔てられたアミノ末端部分を含む共通の構造的構成を共有する。

【0003】

ヒトGDF-8は、アミノ末端プロペプチド部分およびカルボキシ末端成熟部分を含む375アミノ酸長の前駆体タンパク質として合成される。プロペプチドは、Arg-266で成熟GDF-8から開裂される。成熟GDF-8タンパク質は、ジスルフィド結合ホモダイマーとして活性である。タンパク質分解処理後、2つのGDF-8プロペプチドはGDF-8成熟ドメインダイマーと非共有結合により錯体形成したままであり、GDF-8を潜伏不活性状態に維持すると考えられる(Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:9306-9311(2001); Thiesら、Growth Factors 18:251-259(2001)。他のタンパク質も、成熟GDF-8と結合し、その生物活性を阻害することが知られている。このような阻害剤タンパク質としては、フォリスタチンおよびフォリスタチン関連タンパク質、例えば、GASP-1が挙げられる(Gamerら、Dev. Biol. 208:222-232(1999); 米国特許公開番号2003-0180306-A1; 米国特許公開番号2003-0162714-A1)。

10

【0004】

様々な種からの推定アミノ酸配列の位置合わせにより、進化を通してGDF-8が高度に保存されていることが示される(McPheronら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12457-12461(1997)。実際、ヒト、マウス、ラット、ブタ、およびニワトリGDF-8の配列は、C末端領域において100%同一である。ヒヒ、ウシ、およびヒツジGDF-8において、配列は3個のアミノ酸のみが異なる。ゼブラフィッシュGDF-8はさらに多様であるが、それでもヒトと88%同一である。

20

【0005】

GDF-8は、成育中および成体の骨格筋において高度に発現される骨格筋量の負の調節因子である。トランスジェニックマウスにおけるGDF-8ゼロ突然変異は、骨格筋の顕著な肥大および過形成により特徴づけられる(McPheronら、Nature 387:83-90(1997)。骨格筋量における同様の増加は、ウシにおけるGDF-8の天然に存在する突然変異において顕著である(Ashmoreら、Growth 38:501-507(1974); Swatlandら、J. Anim. Sci. 38:752-757(1994); McPheronら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12457-12461(1997); Kambadurら、Genome Res. 7:910-915(1997)。研究ではまた、ヒトにおけるHIV感染に関連する筋肉疲労はGDF-8タンパク質発現の増加を伴うことが証明されている(Gonzalez-Cadavidら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:14938-43(1998))。加えて、GDF-8は筋肉特異的酵素(例えば、クレアチンキナーゼ)の産生を調節でき、また、筋芽細胞増殖を調節することができる(WO 00/43781)。

30

40

【特許文献1】米国仮出願番号60/664,643

【特許文献2】米国特許公開番号2003-0180306-A1

【特許文献3】米国特許公開番号2003-0162714-A1

【特許文献4】WO 00/43781

【特許文献5】米国特許公開番号2004-0142382

【非特許文献1】Kingsleyら、Genes Dev. 8:133-146(1994)

【非特許文献2】Hoodlessら、Curr. Topics Microbiol. Immunol. 228:235-272(1998)

50

【非特許文献3】Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:9306-9311(2001)

【非特許文献4】Thiesら、Growth Factors 18:251-259(2001)

【非特許文献5】Gamerら、Dev. Biol. 208:222-232(1999)

【非特許文献6】McPheronら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12457-12461(1997)

【非特許文献7】McPheronら、Nature 387:83-90(1997)

【非特許文献8】Ashmoreら、Growth 38:501-507(1974)

【非特許文献9】Swatlandら、J. Anim. Sci. 38:752-757(1994)

【非特許文献10】McPheronら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12457-12461(1997)

【非特許文献11】Kambadurら、Genome Res. 7:910-915(1997)

【非特許文献12】Gonzalez-Cadavidら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:14938-43(1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

筋肉組織の増加が治療的に有効であるヒトまたは動物の障害を治療するために、GDF-8の活性を阻害する治療薬を用いることができる。さらに、筋肉量または筋力を増加させること、あるいは、例えば家畜において成長または筋肉組織量を増加させることが望ましい場合がある。したがって、たとえば、筋肉量を増加させるために、あるいは脂肪組織、筋肉、代謝、および骨関連障害を治療するための医薬として、GDF-8の生体活性を調節する因子を投与することは非常に興味深い。

【0007】

例えば、生物学的製剤での治療を受けている個体が遭遇する一つの有害な副作用は、治療薬に対する免疫応答である。GDF-8調節剤の個体への投与は、個体がGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体を発生する原因となる。このような免疫応答は、健康に重大な悪影響を及ぼし得る。GDF-8調節剤のインビボ投与の結果としての免疫複合体の形成は、薬剤の生体内分布およびクリアランス率に影響を及ぼし得る。このような複合体は、循環免疫グロブリンに結合した、投与されたGDF-8調節剤、またはその一部を含む。一般に、免疫複合体の形成は、治療目的に関して利用可能な治療剤の量を減少させ、非標的組織において投与された薬剤が保持される。幾つの場合において、循環免疫複合体は非標的組織、例えば、肝臓および腎臓において蓄積（し、潜在的に損傷）する。

【0008】

GDF-8活性の阻害剤をはじめとする、個体における免疫応答を誘発できるGDF-8調節剤が数多くある。MYO-029は、米国特許公開番号2004-0142382においてさらに詳細に記載されている完全ヒト抗体である。MYO-029は、成熟GDF-8と高い親和性で結合でき、インビトロおよびインビボでGDF-8活性を阻害でき、骨格筋量および骨密度の負の調節と関連してGDF-8活性を阻害できる。MYO-029はマウスに投与された場合に骨格筋量の増大を促進する。

【0009】

GDF-8調節剤と特異的に結合する抗体、例えば、生物学的製剤を検出する方法が望ましい。特に、GDF-8調節剤、例えば、GDF-8阻害剤および抗GDF-8抗体に対する免疫応答の検出および/または定量化を可能にする方法が必要とされる。このような方法は、例えば、GDF-8調節剤に対する抗体の検出、薬剤に対する免疫応答の存在

10

20

30

40

50

の検出または治療の経路のモニタリングまたは最適化、および治療についての対象の評価を可能にする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、生体サンプルにおいてGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法に関する。GDF-8調節剤に対する免疫応答を検出する方法が含まれる。特に、GDF-8調節剤、例えば、GDF-8阻害剤に対する、ヒトをはじめとする動物における免疫応答を評価する方法が本発明において提供される。一つの実施態様において、GDF-8調節剤、例えば、MYO-029に対する抗体の存在を検出する方法が提供される。特に、GDF-8調節剤が投与された個体から得られる生体サンプルにおいてGDF-8調節剤と特異的に結合する中和抗体をはじめとする抗体の存在および/または量を評価する方法が提供される。

10

【0011】

一つの実施態様において、生体サンプルにおいてGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法が提供され、ここにおいて、前記方法は：(a)反応容器においてGDF-8活性についてのインビトロアッセイにGDF-8調節剤を添加し；(b)生体サンプルを反応容器中GDF-8活性についてのインビトロアッセイに添加し；(c)生体サンプルによるGDF-8活性の調節を検出し；(d)生体サンプルの存在下でのGDF-8活性の調節をGDF-8調節剤単独の存在下でのGDF-8活性の調節と比較する工程を含む。ある実施態様において、インビトロアッセイはレポーター遺伝子アッセイである。他の実施態様において、インビトロアッセイは、GDF-8調節剤との特異的結合を検出するためのアッセイ、例えば、免疫学的検定である。

20

【0012】

ある実施態様において、生体サンプルにおいてMYO-029と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：(a)反応容器中、レポーター遺伝子構造を含む宿主細胞を提供し(ここで、前記構造はGDF-8-反応性制御エレメントおよびレポーター遺伝子を含む)；(b)レポーター遺伝子の発現を活性化するために十分な量の成熟GDF-8タンパク質を容器に添加し；(c)レポーター遺伝子のGDF-8活性化を調節するために十分な量のMYO-029を工程(b)の反応容器に添加し；(d)工程(c)の反応容器に生体サンプルを添加し；(e)生体サンプルの存在下および不在下でレポーター遺伝子発現を検出する工程を含む方法が提供される。

30

【0013】

一つの実施態様において、生体サンプルにおいてGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体の検出法であって：(a)GDF-8調節剤を反応容器の表面と接触させ；(b)生体サンプルを反応容器に添加し；(c)検出剤を反応容器に添加し；(d)反応容器の表面と結合したGDF-8調節剤/抗体複合体を検出することを含む方法が提供される。数例において、検出剤は工程(a)のGDF-8調節剤および検出可能な標識である。数例において、検出剤は標識されたGDF-8タンパク質である。

【0014】

もう一つ別の実施態様において、生体サンプルにおいてGDF-8阻害剤に対する抗体を検出する方法が提供される。この方法は：(a)第一GDF-8阻害剤を反応容器の表面と接触させ；(b)生体サンプルを反応容器に添加し；(c)標識された第二GDF-8阻害剤を反応容器に添加し；(d)前記表面と結合した、標識されたGDF-8阻害剤を検出することを含む。幾つかの実施態様において、第一GDF-8阻害剤および第二GDF-8阻害剤は同じである。幾つかの実施態様においては、第一GDF-8阻害剤は、GDF-8と特異的に結合する抗体である。幾つかの実施態様において、第二GDF-8阻害剤は、GDF-8と特異的に結合する抗体である。さらなる実施態様において、GDF-8阻害剤は、BMP-11よりも優先的にGDF-8と結合する。

40

【0015】

さらなる実施態様において、生体サンプルにおいてMYO-029と特異的に結合する

50

抗体を検出する方法であって：(a)単離されたMYO-029を反応容器の表面と接触させ；(b)生体サンプルを反応容器に添加し；(c)標識されたMYO-029を反応容器に添加し；(d)表面と結合した、標識されたMYO-029を検出することを含む方法が提供される。

【0016】

生体サンプルにおいてMYO-029と特異的に結合する抗体を検出する方法も具体例として提供される。この実施態様の方法は：(a)単離されたMYO-029を反応容器の表面と接触させ；(b)反応容器に生体サンプルを添加し；(c)標識されたGDF-8を反応容器に添加し；(d)生体サンプルの存在下および不在下で表面と結合した、標識されたGDF-8を検出することを含む。

10

【0017】

もう一つ別の実施態様において、個体の第一GDF-8阻害剤に対する免疫応答を評価する方法であって：(a)第一GDF-8阻害剤を反応容器の表面と接触させ；(b)生体サンプルを反応容器に添加し；(c)標識された第二GDF-8阻害剤を反応容器に添加し；(d)前記表面と結合した、標識された第二GDF-8阻害剤/抗体複合体を検出することを含む方法が提供され、ここにおいて、標識された複合体の検出は第一GDF-8阻害剤の免疫応答を示す。

【0018】

さらなる実施態様において、個体の第一GDF-8阻害剤に対する免疫応答を評価する方法が提供される。これらの方法は：(a)GDF-8阻害剤を反応容器の表面と接触させ；(b)生体サンプルを反応容器に添加し；(c)標識されたGDF-8タンパク質を反応容器に添加し；(d)試験サンプル中の表面と結合した、標識されたGDF-8タンパク質の量を、対照サンプル中の表面と結合した、標識されたGDF-8タンパク質の量と比較することを含み、ここにおいて、対照サンプルと比較して、試験サンプル中の標識された複合体の減少したレベルの検出は、GDF-8阻害剤に対する免疫応答を示す。

20

【0019】

特定の実施態様において、GDF-8調節剤は、GDF-8と特異的に結合する抗体、GDF-8結合パートナーと特異的に結合する抗体、可溶性GDF-8レセプター、ActRIIBタンパク質、フォリスタチンドメイン含有タンパク質、フォリスタチンタンパク質、GASP-1タンパク質、GDF-8タンパク質、GDF-8プロペプチド、非タンパク質様阻害剤、核酸、および小分子から選択される。幾つかの好ましい実施態様において、GDF-8調節剤はGDF-8阻害剤である。幾つかの好ましい実施態様において、GDF-8調節剤は、GDF-8と特異的に結合する抗体、例えば、MYO-029である。

30

【0020】

ある実施態様において、生体サンプルは、哺乳動物、鳥類、は虫類、または魚類から得られる。幾つかの好ましい実施態様において、生体サンプルはヒトから得られる。特定の実施態様において、生体サンプルは、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、涙液、胃液、滑液、および粘液から選択される。幾つかの好ましい実施態様において、生体サンプルは血清、血液、または血漿である。

40

【0021】

様々な他の実施態様において、標識は、酵素、エピトープ標識、放射性標識、ビオチン、色素、蛍光タグ標識、および発光標識から選択される。標識が酵素である実施態様において、方法は、酵素の存在下で、色、発光、または蛍光を変える基質を添加することをさらに含む。実施態様例において、標識はビオチンであり、方法は、アビジン-酵素複合体を添加することをさらに含む。一つの特定の実施態様において、方法は、酵素の存在下で、色、発光、または蛍光を変える基質を添加することをさらに含む。

【0022】

本発明のさらなる態様および実施態様はを以下の説明の部分に記載され、説明から一部

50

明らかになるか、または本発明の実施により確認できるであろう。この要約および以下の説明は、請求の範囲において提供されるように、本発明を制限することを意図されない。

【 0 0 2 3 】

配列の簡単な説明

G D F - 8、M Y O - 0 2 9、および関連する s c F v フラグメント、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメイン、および相補性決定領域 ( C D R ) の D N A およびアミノ酸 ( A A ) 配列を配列例に記載し、表に列挙する。

【 0 0 2 4 】

【表 1】

表 1

	配列番号
成熟ヒトGDF-8のアミノ酸配列	1
ヒトGDF-8前駆体のアミノ酸配列	2
MYO-029 s c F v のDNA配列	3
MYO-029 s c F v のアミノ酸配列	4
MYO-029 V <sub>H</sub> のDNA配列	5
MYO-029 V <sub>H</sub> のアミノ酸配列	6
MYO-029 V <sub>L</sub> のDNA配列	7
MYO-029 V <sub>L</sub> のアミノ酸配列	8
MYO-029 s c F v の生殖細胞系DNA配列	9
MYO-029 s c F v 生殖細胞系アミノ酸配列	10
生殖細胞系DNA配列V <sub>H</sub>	11
MYO-029 V <sub>H</sub> の生殖細胞系アミノ酸配列	12
MYO-029 V <sub>L</sub> の生殖細胞系DNA配列	13
MYO-029 V <sub>L</sub> の生殖細胞系アミノ酸配列	14
MYO-029 H1のアミノ酸配列	15
MYO-029 H2のアミノ酸配列	16
MYO-029 H3のアミノ酸配列	17
MYO-029 L1のアミノ酸配列	18
MYO-029 L2のアミノ酸配列	19
MYO-029 L3のアミノ酸配列	20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 5 】

本発明は、生体サンプル中のGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法に関する。GDF-8調節剤に対する免疫反応を検出する方法も含まれる。特に、ヒトを包含する動物における外因性GDF-8調節剤、たとえば、GDF-8阻害剤に対する免疫反応を評価する方法も本発明において提供される。1つの実施態様において、GDF-8調節剤、たとえばMYO-029に対する中和抗体の存在を検出する方法が提供される

。特に、G D F - 8 調節剤が投与された個体から得られる生体サンプル中の G D F - 8 調節剤と特異的に結合する抗体の存在および / または量を評価する方法が提供される。

【 0 0 2 6 】

G D F - 8 調節剤が固体に投与される場合、投与された G D F - 8 調節剤に対する免疫反応を検出するための方法は、生体サンプル中の G D F - 8 調節剤と特異的に結合する抗体の存在および / または程度を決定するために有用である。この方法により、たとえば、治療計画の評価、治療の経過の追跡、G D F - 8 調節剤の適性の評価、治療の対象の特定、または医薬の用量の調節も可能になる。方法は、さらに、G D F - 8 調節剤の乱用の特定も可能にする。

【 0 0 2 7 】

本発明をさらに容易に理解するために、ある用語を本明細書において定義する。さらなる定義は、詳細な説明全体にわたって記載されている。

【 0 0 2 8 】

「G D F - 8」なる用語は、特異的な成長および分化因子 - 8 を意味する。この用語は、G D F - 8 の完全長非プロセッシング前駆体形態ならびに翻訳後開裂の結果生じる成熟およびプロペプチド形態を意味する。特に「不活性」として記載されていない限り、「G D F - 8 タンパク質」は 1 以上の G D F - 8 生物学的活性を保持する。この用語はまた、本明細書において前述のような、成熟 G D F - 8 と関連する少なくとも 1 つの生物学的活性を維持する G D F - 8 の任意のフラグメントおよび変異体、たとえば、修飾された配列も意味する。成熟ヒト G D F - 8 のアミノ酸配列は、配列番号 1 において提供され、前駆体、完全長ヒト G D F - 8 配列は、配列番号 2 において提供される。本発明は、これらに限定されないが、ヒト、ウシ、ニワトリ、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、シチメンチョウ、ヒヒ、および魚類を包含する全ての脊椎動物種由来の G D F - 8 に関する ( 配列情報については、たとえば、M c P h e r r o n ら、P r o c . N a t . A c a d . S c i . U . S . A . 9 4 : 1 2 4 5 7 - 1 2 4 6 1 ( 1 9 9 7 ) 参照 ) 。

【 0 0 2 9 】

「成熟 G D F - 8」なる用語は、G D F - 8 前駆体タンパク質のカルボキシ末端ドメインから開裂されるタンパク質を意味する。条件に応じて、成熟 G D F - 8 はモノマーとして、ホモダイマーとして、および / または G D F - 8 潜在複合体において存在し得る。その生物学的に活性な形態において、成熟 G D F - 8 は「活性 G D F - 8」とも呼ばれる。この用語は、修飾された配列を包含する、本明細書において記載される成熟 G D F - 8 に関連する少なくとも 1 つの生物学的活性を維持する G D F - 8 の任意のフラグメントおよび変異体も意味する。

【 0 0 3 0 】

「G D F - 8 プロペプチド」なる用語は、G D F - 8 前駆体タンパク質のアミノ末端ドメインから開裂されるポリペプチドを意味する。G D F - 8 プロペプチドは、成熟 G D F - 8 上のプロペプチド結合ドメインと結合することができる。G D F - 8 プロペプチドは成熟 G D F - 8 ホモダイマーと複合体を形成する。2 つの G D F - 8 プロペプチドは、ホモダイマー中の成熟 G D F - 8 の 2 つの分子と結合して、潜在的複合体と呼ばれる不活性テトラマー複合体を形成すると考えられる。潜在的複合体は、1 以上の G D F - 8 プロペプチドの代わりに、または 1 以上の G D F - 8 プロペプチドに加えて、他の G D F 阻害剤を含み得る。

【 0 0 3 1 】

「G D F - 8 活性」なる用語は、活性 G D F - 8 タンパク質に関連する、1 以上の生理的成長調節または形態形成活性を意味する。たとえば、活性な G D F - 8 は骨格筋量の調節因子である。活性な G D F - 8 は筋肉特異的酵素 ( たとえば、クレアチンキナーゼ ) の産生を調節し、筋芽細胞増殖を刺激し、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化を調節することもできる。「G D F - 8 活性」は、「G D F - 8 結合活性」を包含する。たとえば、成熟 G D F - 8 は、G D F - 8 のプロペプチド領域、A c t R I I B、G D F - 8 レセプター、アクチビン、フォリスタチン、フォリスタチンドメイン - 含有タンパク質、G A S P

10

20

30

40

50

- 1、および他のタンパク質と特異的に結合する。GDF-8 阻害物質、たとえば、抗体またはその一部は、これらの結合活性の1以上を減少させる。インビボおよびインビトロのGDF-8 活性を測定するための手順の例を以下に記載する。

#### 【0032】

「GDF-8 調節剤」なる用語は、GDF-8、またはその医薬的に許容される誘導体の活性、発現、プロセッシング、または分泌を調節できる任意の作用物質を包含する。1以上のGDF-8 活性を増大させる作用物質および1以上のGDF-8 活性を減少させる作用物質もこの用語に含まれる。「GDF-8 阻害剤」なる用語は、GDF-8、またはその医薬的に許容される誘導体の活性、発現、またはプロセッシングに影響を及ぼすことができる任意の作用物質を包含する。GDF-8 阻害剤は、GDF-8 に関連する1以上の活性を減少させる。ある実施態様において、GDF-8 阻害剤は、GDF-8 の、1以上のその生理学的結合パラメータ、たとえばこれに限定されないが、レセプター（たとえば、ActRIIB）、フォリスタチンドメイン含有タンパク質（たとえば、フォリスタチン、FLRG、GASP-1、GASP-2）、またはGDF-8 タンパク質、たとえば、GDF-8 プロペプチドおよびその突然変異体および誘導体との結合に影響を及ぼす。このようなGDF-8 阻害剤は、たとえば、GDF-8 と特異的に結合する抗体（MYO-029、MYO-028、MYO-022、JA-16、およびそのフラグメントおよび誘導体を包含する）、GDF-8 レセプターと特異的に結合する抗体（たとえば、米国特許第6,656,475号、米国特許公開番号2004/0077053-A1参照）、修飾可溶性レセプター（レセプター融合タンパク質、たとえば、ActRIIB-Fc融合タンパク質を包含する）、GDF-8 と特異的に結合する他のタンパク質（たとえば、GDF-8 プロペプチド、GDF-8 プロペプチドの突然変異体および誘導体、フォリスタチン、フォリスタチンドメイン含有タンパク質、およびこれらのタンパク質のFc融合体）、GDF-8 レセプターと結合するタンパク質これらのタンパク質のFc融合体、および模倣物も含まれる。非タンパク質様阻害剤（たとえば、核酸）もGDF-8 阻害剤なる用語に含まれる。GDF-8 阻害剤は、タンパク質、抗体、ペプチド、ペプチド模倣物、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、二本鎖RNA、siRNA（たとえば、RNAi）、および他の小分子であって、GDF-8 を特異的に阻害するものを包含する。このような阻害剤は、GDF-8 の生物学的活性を「阻害」、「減少」または「中和」と言われ、以下にさらに詳細に記載する。

#### 【0033】

「GDF-8 阻害剤」は、GDF-8 の少なくとも1つの生物学的活性、たとえば、活性なGDF-8 タンパク質と関連する生理学的、成長調節、または形態形成活性を「阻害」、「中和」、または「減少」させる。たとえば、GDF-8 は骨格筋成長の負の調節因子である。GDF-8 阻害剤は、筋肉量を増大させ、筋力を増大させ、筋肉特異的酵素（たとえば、クレアチンキナーゼ）のレベルを調節し、筋芽細胞増殖を刺激し、前脂肪細胞が分化して脂肪細胞になることを調節し、脂肪蓄積を減少させ、血清トリグリセリドレベルを減少させ、血清コレステロールレベルを減少させ、グルコース代謝を調節し、高血糖症を軽減することができる。さらに、GDF-8 はGLUT4のインスリン誘発性発現をブロックし、インスリンによる前脂肪細胞の分化をブロックする。

#### 【0034】

「阻害する」、「阻害性」なる用語およびその同義語は、GDF-8 阻害剤の不在下でのGDF-8 の活性に対する、GDF-8 阻害剤によるGDF-8 の1以上の活性の減少を意味する。活性の減少は、好ましくは少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。ある実施態様において、GDF-8 の活性は、GDF-8 阻害剤の不在下でのGDF-8 タンパク質に対して、1以上の現在開示されている阻害剤により影響を受ける場合、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、または88%、さらに好ましくは少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、または99%、およびなおいっそう好ましくは

10

20

30

40

50

少なくとも95%~100%減少する。「中和する(neutralize)」、「中和する(neutralizing)」なる用語およびその同義語は、1以上のGDF-8活性の少なくとも80%、85%、90%、または95%の減少を意味する。GDF-8活性の阻害はThiesら、Growth Factors 18:251-259(2001)において記載されているようなpGL3(CAGA)<sub>1,2</sub>レポーター遺伝子アッセイ(RGA)、またはたとえば以下に示されるようなActRIIBレセプターアッセイにより測定できる。

#### 【0035】

本明細書において用いられる「抗体」なる用語は、免疫グロブリンまたはそのフラグメントなどの、抗原結合部位を含む任意のポリペプチドであり、その供給源、起源の種、産生方法、および特性に関係なく、抗原結合部位を含む任意のポリペプチドを包含する。非制限的例として、「抗体」なる用語は、合成、ヒト、オランウータン、サル、霊長類、マウス、ラット、ヤギ、イヌ、ヒツジ、およびニワトリ抗体を包含する。この用語は、これに限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異的、多特異的、非特異的、ヒト化、単鎖、キメラ、合成、組み換え、ハイブリッド、突然変異、およびCDR移植抗体を包含する。本発明の目的に関して、「抗体」はさらに、反対の記載しない限り(「無傷」なる用語がその前にある場合など)、抗体フラグメントも包含する。抗体フラグメントの例は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、dAb、および抗原結合機能を保持する他のフラグメントを含む。典型的には、このようなフラグメントは、抗原結合ドメインを含む。当業者により認識されるように、このような分子のいずれか、たとえば「ヒト」抗体は、免疫原性を減少させるか、その親和性を増大させるか、その特異性を変更するか、または他の目的のために操作(たとえば、生殖)することができる。

#### 【0036】

抗体は、たとえば、伝統的なハイブリドーマ技術(Kohlerら、Nature 256:495-499(1975))、組み換えDNA法(米国特許第4,816,567号)、または抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ技術(Clacksonら、Nature 352:624-628(1991); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991))により調製できる。様々な他の抗体産生技術については、Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlowら、Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照。

#### 【0037】

「抗原結合ドメイン」なる用語は、抗原の一部または全部と特異的に結合するか、または相補的である部分を含む、抗体分子の部分の意味する。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定の部分とのみ結合する。「エピトープ」または「抗原決定因子」とは、抗体の抗原結合ドメインとの特異的相互作用に關与する抗原分子の一部である。抗原結合ドメインは1以上の抗体可変ドメインにより提供することができる(たとえば、V<sub>H</sub>ドメインからなるFd抗体フラグメント)。ある実施態様において、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)および抗体重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含む(米国特許第5,565,332号)。

#### 【0038】

「特異的結合」、「特異的に結合する」などの用語は、2以上の分子が、生理的またはアッセイ条件下で測定可能であり、選択的である複合体を形成することを意味する。抗体または他の阻害剤は、適当に選択された条件下で、このような結合が実質的に阻害されず、一方、非特異結合は阻害されるならばタンパク質と「特異的に結合する」と言われる。特異的結合は、比較的高い親和性により特徴づけられ、化合物またはタンパク質に対して選択的である。非特異結合は通常低い親和性を有する。典型的には、結合は親和性定数K<sub>d</sub>が少なくとも約10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>、または好ましくは少なくとも約10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>、または10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>である場合に特異的と見なされる。ある方法は、特異的結合に対して高い親和性を必要とするが、他の方法、たとえば、表面プラズモン共鳴アッセイ

10

20

30

40

50

はより安定性の低い複合体およびより低い親和性相互作用を検出し得る。必要ならば、非特異的結合は、結合条件を変えることにより特異的結合に実質的に影響を及ぼすことなく減少させることができる。このような条件は当該分野において公知であり、当業者は慣用技術を用いて適当な条件を選択できる。条件は通常、結合パートナーの濃度、溶液のイオン強度、温度、結合に許容される時間、関連しない分子の濃度（たとえば、血清アルブミン、ミルクカゼイン）などに関して定義される。結合条件の例は、実施例において記載される。

#### 【0039】

「単離された」なる用語は、その自然環境が実質的にない分子を意味する。たとえば、単離されたタンパク質は細胞物質またはこれが由来する細胞または組織源からの他のタンパク質が実質的にない。この用語は、単離されたタンパク質が治療組成物として投与されるために十分純粋であるか、または少なくとも70%から80%（w/w）純粋であり、さらに好ましくは少なくとも80%～90%（w/w）純粋であり、なおいっそう好ましくは90～95%純粋であり；もっとも好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%（w/w）純粋であることをさす。

10

#### 【0040】

「個体」なる用語は、任意の脊椎動物、たとえば、哺乳動物、鳥類、は虫類、両生類、または魚類を意味する。「哺乳動物」なる用語は、たとえば、ヒト、ヒト以外の霊長類、サル、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシなどをはじめとする、そのようなものとして分類される、オスまたはメスの任意の動物を包含する。哺乳動物以外の動物の例としては、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、魚類、サケ、ナマズ、バス、カエル、およびマスが挙げられる。個体は、たとえば、ヒト、スポーツ選手、または家畜、家畜類、動物園の動物、スポーツ用動物、レース用動物、またはペット動物から選択することができる。

20

#### 【0041】

「有効用量」または「有効量」なる用語は、GDF-8関連障害を有する個体を包含する個体において臨床症状を改善するか、または所望の生物学的成果（たとえば、筋肉量、筋力、および/または骨密度の増大）を達成するために十分である用量またはレベルを意味する。このような量は、たとえば、骨格筋量および骨密度の負の調節に関連するGDF-8の活性を減少させるために十分であるべきである。治療成果および臨床症状は、体脂肪の減少、筋肉量の増大、改善された心臓血管指標、または改善されたグルコース代謝調節を包含し得る。GDF-8阻害剤は、たとえば、筋肉量、筋力を増大させ、筋肉特異的酵素（たとえば、クレアチンキナーゼ）のレベルを調節し、および/または筋芽細胞増殖を刺激することができる。好ましい実施態様において、GDF-8阻害剤は、GDF-8関連疾患の臨床症状を軽減する。GDF-8調節剤は、たとえば、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化を調節し、脂肪蓄積を減少させ、血清トリグリセリドレベルを減少させ、血清コレステロールレベルを減少させ、グルコース代謝を調節し、骨密度を調節し、高血糖症を軽減することができる。GDF-8阻害剤は、筋肉量を増加させるか、運動能力を改善するか、あるいは筋肉成長をはじめとする成長を増加または促進するために投与することもできる。有効量は、次の章において記載されるようにして決定できる。GDF-8阻害剤の「治療的に有効な量」とは、障害または再発性障害の治療、予防、治癒、遅延、重篤性の軽減、または少なくとも1つの症状の改善、あるいはこのような治療がない場合に予想されるものを超えた患者の生存の延長を目的として、個体（たとえば、ヒト）に1回量または複数回投与量を投与することにより有効である量を意味する。

30

40

#### 【0042】

「GDF-8関連障害」とは、対象がGDF-8調節剤、たとえば、GDF-8阻害剤の投与から恩恵を受けるであろう障害または状態である。GDF-8関連障害は、内科的疾患、たとえば、筋肉関連または神経筋障害または状態、あるいは脂肪組織、代謝、または骨関連障害または状態を包含する。

#### 【0043】

50

GDF-8阻害剤の投与は、症状または障害の改善および/または予防を包含する、障害の治療のためにこの阻害剤が投与される場合、「治療的」である。治療的使用は、内科的疾患を有する個体または最終的に障害を獲得し得る個体に、障害または再発性障害の予防、治癒、遅延、重篤性の軽減、または1以上の症状の改善のために、あるいはかかる治療がない場合の予想を超えて対象の生存を延長するために投与することを含む。GDF-8阻害剤は、たとえば、筋肉量、筋力を増加させ、筋肉特異的酵素（たとえば、クレアチンキナーゼ）のレベルを調節し、筋芽細胞増殖を刺激することができる。GDF-8調節剤は、たとえば、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化を調節し、脂肪蓄積を減少させ、血清トリグリセリドレベルを減少させ、血清コレステロールレベルを減少させ、グルコース代謝を調節し、骨密度を調節し、高血糖症を軽減することができる。GDF-8阻害剤はさら

10

#### 【0044】

「高ストリンジェント」または「高ストリンジェンシー」なる用語は、核酸-核酸相互作用を決定するために用いられるハイブリッド形成および洗浄のための条件を説明する。このような条件は、当業者には公知であり、たとえば、Wileyら、Current Protocols in 分子 Biology、John Wiley & Sons、N.Y.、6.3.1-6.3.6(1989)において見出すことができる。当該分野において記載されているような水性および非水性条件はどちらも使用できる。高ストリンジェントハイブリッド形成条件の一例は、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でハイブリッド形成し、それに続いて、0.2XSSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)中50で少なくとも1回洗浄する。高ストリンジェントハイブリッド形成条件の他の例は、6XSSC中、約45(または50、60、または65)でのハイブリッド形成と、それに続く0.2XSSC、0.1%SDS中約55、60または65での少なくとも1回の洗浄を含む。高ストリンジェント条件は、0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDS中65でのハイブリッド形成と、それに続く0.2XSSC、1%SDS、65での少なくとも1回の洗浄であってもよい(たとえば、Sambrookら、分子 Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989参照)。

20

30

#### 【0045】

「実質的に同一」または「実質的に類似」なる語句は、たとえば、本発明のGDF-8阻害剤などの関連するアミノ酸またはヌクレオチド配列が、開示された配列と比較して(保存されたアミノ酸置換により)同一であるかまたは実質的でない差を有することを意味する。本発明のヌクレオチドおよびポリペプチドは、たとえば、開示された核酸分子およびポリペプチドと少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%配列が同一であるものを含む。

#### 【0046】

ポリペプチドについて、少なくとも20、30、50、100、またはそれ以上のアミノ酸をもとのポリペプチドおよび原型と実質的に同一である変異ポリペプチド間で比較する。核酸について、少なくとも50、100、150、300またはそれ以上のヌクレオチドをもとの核酸および原型と実質的に同一である変異体核酸間で比較する。かくして、「実質的に同一」の定義を依然として満たしながら、変異体は実質的にある領域が同一であるが、他の領域において異なる。2つの配列間の同一性(%)は、標準的整列アルゴリズム、たとえば、Altschulら、J. Mol. Biol.、215:403-410(1990)により記載されているBasic Local Alignment Tool(BLAST)、Needlemanら、J. Mol. Biol.、48:444-453(1970)のアルゴリズム、またはMeyersら、Comput. Appl. Biosci.、4:11-17(1988)のアルゴリズムにより決定

40

50

される。

【0047】

「変異体」なる用語は、たとえば、それぞれ提供されたGDF-8阻害剤のヌクレオチドおよびアミノ酸配列と実質的に同一または類似したヌクレオチドおよびアミノ酸配列を意味する。変異体は、天然に存在するものであり得、たとえば、天然に存在するヒトおよびヒト以外のヌクレオチド配列であるか、または人工的に生成させることができる。変異体の例は、mRNAの別のスプライシング、たとえば、3'および5'スプライス変異体の両方、点突然変異および他の突然変異、またはタンパク質のタンパク質分解開裂から得られるものである。変異体は、核酸分子またはそのフラグメントおよびアミノ酸配列およびそのフラグメントであって、それぞれ他の核酸（あるいはこれらが最適に整列された場合（適当な挿入または欠失を伴う）、その相補鎖）またはアミノ酸配列と実質的に同一または類似したものを包含する。一つの実施態様において、最適に整列された場合、それぞれ、本発明の核酸分子またはタンパク質と別の核酸分子またはタンパク質の間に少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性がある。さらに、変異体は、本出願において議論されているように、GDF-8活性を示すか、またはGDF-8活性を阻害するタンパク質またはポリペプチドを包含する。

10

【0048】

「生体サンプル」は、個体、たとえば、細胞、組織、器官、または液体から集められた生物学的物質である。生体サンプルの例としては、血清、血液、および血漿が挙げられる。

20

【0049】

「反応容器」なる用語は、その中でインビトロアッセイ、たとえば、GDF-8調節剤と抗体の間の会合反応が起こり、検出できる容器を意味する。「表面」とは、任意の固体（たとえば、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、硫酸デキストラン、または処理されたポリプロピレン）の外側部分であって、これにGDF-8調節剤を直接または間接的に「接触させる」か、「固定するか」、または「コーティングする」ことができるものである。「反応容器の表面」は、容器自体の一部であってもよいし、あるいは表面は反応容器中であってもよい。表面、たとえば、ポリスチレンは、化学または放射線処理に付して、その表面の結合特性を変えることができる。中程度の結合、高い結合、アミノ化、および活性化表面はこの用語に含まれる。GDF-8調節剤は、たとえば表面に対する物理的吸着または共有結合により直接表面と接触させることができるか、またはたとえば表面と直接接触する物質または部分との相互作用により間接的に接触させることができる。

30

【0050】

本明細書において用いられる「捕捉剤」なる用語は、タンパク質などの分子であって、たとえば、GDF-8調節剤またはGDF-8それ自体などの標的タンパク質と特異的に結合するために免疫学的検定において用いられる分子を意味する。本発明の方法に適した捕捉剤は、GDF-8調節剤および/またはGDF-8タンパク質と特異的に結合する。たとえば、捕捉剤は、成熟GDF-8ダイマー、またはGDF-8タンパク質と特異的に結合するタンパク質をはじめとするGDF-8タンパク質であってよい。同様に、捕捉剤は、GDF-8調節剤またはGDF-8調節剤と特異的に結合するタンパク質であってよい。

40

【0051】

「検出剤」は、タンパク質または小分子であって、GDF-8調節剤に対する抗体に特異的に結合するものである。検出剤は、任意に、検出可能な標識を含んでもよい。検出剤は、検出可能な標識を含む検出剤により、それ自体検出可能であってもよい。「標識」なる用語は、その化学的性質により、アッセイ的に特定可能なシグナルを提供し、これにより分子相互作用の検出が可能になる分子を意味する。抗体をはじめとするタンパク質は、（たとえば、発色団、フルオロフォア、または放射線同位元素により）直接検出できるか

50

、または（たとえば、着色、発光、または蛍光生成物を産生する反応を触媒することにより）間接的に検出できる分子と共有結合または非共有結合するならば、検出可能な標識を有する。

【0052】

本発明は、GDF-8調節剤に対する免疫応答を検出する方法、ならびに生体サンプル中のGDF-8調節剤に対する抗体を検出する方法に関する。一つの実施態様において、この方法は、抗体、特にインビボ治療的GDF-8調節剤の構成成分、たとえばGDF-8阻害剤と結合できる抗体を検出する。いくつかの実施態様において、アッセイ法は、中和抗体、たとえば、GDF-8調節剤の作用を阻害する抗体を検出する。特定の実施態様において、アッセイ法は、MYO-029のGDF-8に対する結合を阻害する抗体を検出する。この方法は、ヒト患者の治療抗体、または他のGDF-8調節剤、たとえば、GDF-8の生物学的活性を阻害するものを受容することに対する適合性を評価するのに有用である。ある具体例において、この方法は、MYO-029に対する生体サンプル中の抗体の存在を検出する。

10

【0053】

GDF-8関連障害を有する個体、GDF-8関連障害を発症する危険性がある個体、GDF-8調節剤を用いた治療を受けている個体、およびGDF-8調節剤投与の対象である個体は、本発明において提供される方法の対象であり得る。本発明の方法は、有害な免疫応答の検出または予防、および/またはGDF-8調節剤の有効性、生物学的安定性、または使用の適合性を評価することができる。

20

【0054】

GDF-8関連障害、たとえば、筋肉関連障害または神経筋障害を発症する危険性がある個体は、本発明において提供される方法の対象である。GDF-8活性の阻害は、筋肉関連障害にかかっている個体をはじめとする個体において筋肉組織を増加させる。多くの障害は、たとえば、機能が損なわれた筋肉または神経組織に関連し、たとえば、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、サルコペニア、カヘキシー、筋肉疲労、筋萎縮、あるいは疲労、萎縮、または弱さを包含する筋肉変性である。筋ジストロフィーは、たとえば、偽肥大性、顔面肩甲上腕型、および肢体筋ジストロフィーを包含する。筋ジストロフィーの例は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（Leyden-Moebius）、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイファス型ジストロフィー、肢体筋ジストロフィー、硬直脊椎症候群、ウルリッヒ症候群、フクヤマ筋ジストロフィー、ウォーカー・ワールブルグ症候群、筋眼脳病（muscle eye brain disease）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（Landouzy-Dejerine）、先天性筋ジストロフィー、筋剛直性ジストロフィー（シュタイネルト病）、先天性筋硬直症、およびガワーズ病を包含する。

30

【0055】

GDF-8関連筋肉障害は心臓血管疾患に関連する筋肉変性、または器官萎縮、臓器不全、癌などの別の疾患または状態に続発するものから選択される障害も包含する。後天性免疫不全症候群（AIDS）、床上安静、運動不足、長期間の不使用、あるいは他の障害または状態もこの用語に含まれる。

40

【0056】

脂肪組織障害（たとえば、肥満）、心臓血管障害（筋肉喪失または筋肉疲労に関連する場合）、およびインスリン代謝の障害にかかっているか、または発症の危険性がある個体は、対象になり得る。同様に、骨の喪失に関連する障害、たとえば、骨粗鬆症、特に高齢および/または閉経後の女性において、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症、骨減少症、変形性関節症、および骨粗鬆症に関連する骨折を有するか、または発症の危険性がある個体は本発明における方法の対象である。他のGDF-8関連状態は、代謝性骨疾患および低い骨量、たとえば、慢性グルココルチコイド療法、早期性腺機能不全、アンドロゲン抑制、ビタミンD欠乏、二次性副甲状腺機能亢進症、栄養失調、および拒食症により特徴づけられる障害を包含する。

50

## 【 0 0 5 7 】

心臓血管障害の例は、冠動脈疾患（アテローム性動脈硬化症）、狭心症（急性狭心症および不安定狭心症を包含する）、心臓発作、脳卒中（虚血性脳卒中を包含する）、高血圧関連心臓血管疾患、心不全、鬱血性心不全、冠動脈疾患、高血圧、脂質異常症、末梢動脈障害、および末梢血管障害を包含する。インスリン代謝の障害の例は、異常なグルコース恒常性、2型糖尿病、前糖尿病、耐糖能異常、脂質異常症、メタボリック症候群（たとえば、X症候群）、および外傷、たとえばやけどまたは窒素のアンバランスにより誘発されるインスリン耐性に関連する状態を包含する。

## 【 0 0 5 8 】

さらに、筋肉量または筋力の増加、たとえば、運動能力の改善または家畜動物における成長または筋肉組織量の増大を望む個人は本発明により提供される方法の対象である。筋肉量の増加、たとえば筋肉細胞サイズの増大（肥大）または筋肉細胞数の増大（過形成）を示す個体は、外因性GDF-8調節剤に対する抗体を検出する方法の対象であり得る。増加は、哺乳動物または他の動物の1型および/または2型筋繊維であり得る。筋肉量における増加を測定する方法は当該分野において周知である。たとえば、筋肉は、標準的技術、たとえば、水中秤量を用いて、GDF-8調節剤の投与の前後に測定することができる。筋肉サイズにおける増加は、少なくとも約5%、10%、20%、またはそれ以上の増量により証明することができる。

10

## 【 0 0 5 9 】

一つの実施態様において、本発明は、少なくとも1つの個体からの生体サンプルにおいてGDF-8調節剤と特異的に結合する抗体を検出する方法であって：（a）反応容器中でGDF-8活性についてのインビトロアッセイにGDF-8調節剤を添加する工程；（b）反応容器中でGDF-8活性についてのインビトロアッセイに生体サンプルを添加する工程；（c）生体サンプルによるGDF-8活性の調節を検出する工程；および（d）生体サンプルの存在下でのGDF-8活性の調節をGDF-8調節剤単独の存在下でのGDF-8活性の調節と比較する工程を含む方法を提供する。ある実施態様において、インビトロアッセイは、たとえば、酵素免疫測定法（ELISA）様式における抗体のGDF-8剤に対する結合を検出する免疫学的検定である。一つの実施態様において、GDF-8剤に対する結合は、検出可能な標識を有するGDF-8調節剤である検出剤で検出される。別の実施態様において、検出剤は、標識されたGDF-8タンパク質である。もう一つ別の実施態様において、インビトロアッセイは、レポーター遺伝子アッセイなどのGDF-8活性についての細胞に基づいたアッセイ法である。

20

30

## 【 0 0 6 0 】

ある実施態様において、インビトロアッセイは、活性なGDF-8タンパク質に関連する1以上の生理的成長調節または形態形成活性を測定する。GDF-8活性の調節を検出するためのインビトロアッセイは、細胞に基づくアッセイまたは無細胞アッセイ法（たとえば、転写、複製または細胞周期阻止の調節を測定するためのアッセイ法）または結合アッセイ（たとえば、免疫学的検定、表面プラズモン共鳴アッセイ法、免疫沈降、または放射性免疫アッセイ）から選択される。たとえば、活性なGDF-8は骨格筋肉量の負の調節因子であり、筋肉特異的酵素（たとえば、クレアチンキナーゼ）の産生を調節し、筋芽細胞増殖を刺激し、前脂肪細胞の脂肪細胞への分化を調節する。いくつかの方法において、BMP-11調節剤からのGDF-8調節剤の選択が行われる。GDF-8活性についての細胞に基づくアッセイ法および無細胞アッセイ法は、当該分野において公知であり、以下に記載する。

40

## 【 0 0 6 1 】

## 結合アッセイ

一つの実施態様において、本発明は、1以上の患者サンプルから選択される生体サンプルにおける抗体の存在を検出する方法を含み、この方法は：（a）GDF-8調節剤を反応容器の表面と接触させる工程；（b）生体サンプルを反応容器に添加する工程；（c）検出剤を反応容器に添加する工程；および（d）反応容器の表面と結合したGDF-8調

50

節剤 / 抗体複合体を検出する工程を含む。2つの例を図1および2において示す。

【0062】

ある実施態様の工程(a)において、GDF-8調節剤を、たとえば、表面に対する共有結合または非共有結合のいずれかにより、反応容器の表面と接触させる。接触は、直接的であっても、間接的であってもよい。固体表面は典型的にはガラスまたはポリマー、たとえば、セルロース、硫酸デキストラン、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンであり、磁気または常時性ビーズをはじめとするビーズの形態であってもよい。表面を、たとえば、化学または放射線処理により修飾して、表面の結合特性に影響を及ぼすことができる。表面上のリガンドの固定化は、共有または非共有相互作用、たとえば、物理的吸着により達成できる。GDF-8調節剤、たとえば、MYO-029は、反応容器の表面に直接に吸着され得る。他の実施態様において、GDF-8調節剤は、前記薬剤と共有結合したビオチン分子の、反応容器の表面と接触したアビジン分子との相互作用により、反応容器表面と結合させることができる。共有結合法は、架橋剤、たとえば、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアネート、スルホ含有剤、ペプチド、アルキル化剤、または類似の試薬とのカップリングを包含する。いくつかの好ましい実施態様において、GDF-8調節剤は、GDF-8と特異的に結合する抗体、GDF-8と特異的に結合するモノクローナル抗体、GDF-8、MYO-029、MYO-028、MYO-022、またはJA-16に対する中和抗体、あるいはそのフラグメントである。これらのGDF-8阻害剤の構造的および機能的特性は、たとえば、米国特許公開番号2004/0142382-A1および2003/0138422-A1に記載され、これらの部分は全文書を組み入れることに加えて参照として本発明に特に組み入れられる。特に、ある中和抗体、たとえば、MYO-029の特性は、米国特許公開番号2004/0142382-A1の段落54-90、および請求項1-42において記載されている。同様に、米国特許公開番号2003/0138422-A1の抗体阻害剤は、段落56-70、93-110、および請求項1-54に記載されている。

10

20

【0063】

ある実施態様において、GDF-8調節剤の反応容器の表面との接触後、反応容器を洗浄して、生体サンプルの添加前に未結合GDF-8調節剤を除去する。非特異性相互作用は、ブロッキング工程に関して最小限に抑えられ、ここで、少なくとも1つのブロッキング剤、たとえば、標的と特異的に結合しないタンパク質を含む緩衝液を反応容器に添加する。他の実施態様において、界面活性剤は、たとえば、イオン性または非イオン性界面活性剤を添加することができる。ブロッキング緩衝液は、たとえば、血清、ウシ血清アルブミン、乳、カゼイン、ゼラチン、および/または非イオン性界面活性剤を含むことができる。いくつかの実施態様において、反応容器を約pH 5から約pH 9の間の緩衝液、たとえば、クエン酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、Tris緩衝液または酢酸塩緩衝液で洗浄する。

30

【0064】

ある実施態様は、工程(b)を含み、ここにおいて、生体サンプルは反応容器に添加される。試験される生体サンプルは、血清、血液、血漿、生検標本、組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、脳脊髄液、羊水、乳、初乳、乳腺分泌物、リンパ、尿、汗、および涙液から選択することができる。好ましい実施態様において、生体サンプルは流体である。いくつかの好ましい実施態様において、生体サンプルは、血液、血清、および血漿から選択される。特定の実施態様において、生体サンプルは、血清、たとえば、ヒト、サル、ラット、またはマウス血清である。

40

【0065】

他の実施態様において、生体サンプルは個体から単離され、試験前に任意に処理されていてもよい。生体サンプルは、集めたままで使用することができるか、または好適な希釈剤で希釈した後に使用することができる。希釈は、アッセイに関するマトリックス干渉を減少および/または除去するために最適化される。希釈剤は、特に限定されないが、脱イオン水または約pH 5から約pH 9の範囲、好ましくは約pH 6.5からpH 8

50

． 5 の範囲内で緩衝作用を有する様々な緩衝液（たとえば、クエン酸緩衝液、リン酸塩緩衝液、T r i s 緩衝液、酢酸塩緩衝液、ホウ酸塩緩衝液）を含むことができる。いくつかの好ましい実施態様において、希釈剤は、正常ヒト血清を含む。希釈剤は、たとえば、サンプルマトリックスのバックグラウンド効果または干渉を抑制するために試験生体サンプルに対応して選択される、一定濃度の対照生体サンプルを含むことができる。

【 0 0 6 6 】

一つの実施態様において、ヒト血清の試験サンプルは、T H S T ( 5 0 m M T r i s - H C l 、 p H 8 . 0 、 1 . 0 m M グリシン、0 . 5 M N a C l 、 および 0 . 0 5 % ( v / v ) T w e e n 2 0 ( 登録商標 ) を含有 ) 緩衝液中に 1 : 8 倍に希釈することができ、8 倍を超える試験サンプルの希釈物が T H S T + 1 2 . 5 % ヒト血清中で調製される。サンプルをおよそ 2、4、8、16、32、64、または 128 倍に希釈することができる。他の実施態様において、試験サンプルを連続して、1 : 1 . 5 または 1 : 1 . 6 に希釈して、希釈直線性およびマトリックス効果の証明を可能にするある範囲のデータポイントを得ることができる。好ましい生体サンプルマトリックスに関して、マトリックス干渉およびアッセイ感度が最適化される希釈度を選択することができる。

10

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施態様において、サンプルは、任意に、周知の方法を用いて分画または濃縮することができ、次いで本明細書に記載された G D F - 8 調節剤を検出するための方法に添加することができる。たとえば、マトリックス干渉がアッセイにおける G D F - 8 調節剤の検出を制限するならば、分画（精製を含む）または濃縮を使用できる。分画および濃縮技術は、これに限定されないが、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿、ポリエチレングリコール沈殿、トリクロロ酢酸（T C A）沈殿、親和性技術（たとえば、抗体、すなわち、抗ヒト F c 抗体、タンパク質 A またはタンパク質 G などの特異的結合パートナーと結合した樹脂を用いた免疫沈降）、クロマトグラフィー技術、および他の分離技術を包含する。好ましい実施態様において、生体サンプルは、G D F - 8 調節剤の検出前に分画または濃縮されない。

20

【 0 0 6 8 】

生体サンプルは投薬を受けていない個体から集めることができるか、またはサンプルは G D F - 8 調節剤の投与前、投与中、または投与後に採取できる。たとえば、サンプルは、G D F - 8 調節剤の投与後 1、2、4、6、8、10、12、15、20、25、30 日、またはそれ以上の個体から得ることができる。サンプルは、G D F - 8 調節剤投与後 1、2、3、4、6、8、10、12、16 週、またはそれ以上の個体から得ることもできる。循環 G D F - 8 調節剤の実質的な量は、本発明において提供される方法のある実施態様における薬剤に対する抗体の検出を含むので（たとえば、実施例 7 参照）、サンプル収集のタイミングは、G D F - 8 調節剤からの干渉を軽減するために最適化することができる。抗体応答の持続は、延長された時点を調べることによっても試験される。いくつかの場合において、1 年まで、またはそれを超える時点が適当である。

30

【 0 0 6 9 】

ある実施態様において、試験されるサンプルのアリコートを固定化抗原と接触させ、任意の抗体をサンプル中に存在する G D F - 8 調節剤と結合させ、抗体 / G D F - 8 調節剤複合体を形成させるために十分な時間（たとえば、2 ~ 120 分、1 ~ 4 時間）、適当な条件下（たとえば、23）でインキュベートする。他の実施態様において、G D F - 8 調節剤 / 抗体反応は特に限定されないが、従来免疫学的検定に関して通常使用される条件下で行うことができる。典型的な手順は、抗体および G D F - 8 調節剤を含む反応系を、一般に 45 を超えない温度、好ましくは約 4 から約 40 の間、さらに好ましくは約 23 から約 40 の間で、約 0 . 5 から 40 時間の間、好ましくは約 1 から約 20 時間の間インキュベートするか、または静置することを含む。好ましい実施態様において、反応緩衝液は、反応またはその検出の干渉を回避するために選択される。したがって、実施態様は、これに限定されないが、約 p H 5 から約 p H 9 の間の緩衝液、たとえば、クエン酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、T r i s 緩衝液、および酢酸塩緩衝液を包含する。

40

50

## 【0070】

ある実施態様において、工程(c)は検出剤を反応容器に添加することを含む。インキュベーション期間の後、GDF-8調節剤に対する固定化抗体は、いくつかの実施態様において、緩衝液で洗浄して、工程(c)の前に、未結合溶質を除去する。他の実施態様において、同時定量を行い、これにより工程(b)および(c)が同時に起こる。

## 【0071】

工程(c)が工程(b)後に行われる特定の実施態様において、手順は、抗体および検出剤を一般に45を超えない温度、好ましくは約40および約40の間、さらに好ましくは、約25から約40の間で、約0.5から40時間の間、好ましくは約1から約20時間の間インキュベートするか、または静置することを含むことができる。ある実施態様において、反応緩衝液は、反応またはその検出を干渉しないように選択される。したがって、実施態様は、これに限定されないが、約pH 5から約pH 9の間の緩衝液、たとえば、クエン酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、Tris緩衝液、および酢酸塩緩衝液を包含する。

10

## 【0072】

ある実施態様において、検出剤は、GDF-8調節剤と特異的に結合する抗体と特異的に結合できる分子である。いくつかの実施態様において、検出剤は、検出可能な標識を含む。ある好ましい検出剤は、ある免疫グロブリン、およびヒト免疫グロブリン配列と結合できる試薬(ヤギ抗ヒト抗体、タンパク質A、タンパク質Gなどを包含する)、たとえば、免疫グロブリンの定常領域を包含する。GDF-8調節剤と特異的に結合する免疫グロブリンの定常部分が含まれる。MYO-029は、ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1であり、様々な実施態様において、検出剤は、ラムダ軽鎖を有するヒト免疫グロブリンを結合できる試薬を包含する。他の実施態様において、非ヒトIgG1免疫グロブリンと結合できる薬剤が含まれる。様々な実施態様において、検出は定性的であるか、または定量的である。いくつかの実施態様において、標識は、装置の力をかりずに視覚的手段により検出できる。

20

## 【0073】

好ましい実施態様において、検出剤、たとえば、MYO-029または成熟GDF-8ダイマーはビオチニル化されている。たとえば、機能的、成熟GDF-8タンパク質は、実施例12において記載されるアミン特異性試薬でビオチニル化することができる。同様に、別の調製法において、潜在複合体中のGDF-8タンパク質は、米国特許公開番号2004/0142382 A1の実施例1のアッセイ法に従って、産生され、単離される。潜在的複合体は、周知技術および/または本発明において記載されている技術を用いてその後ビオチニル化される。

30

## 【0074】

成熟GDF-8は、たとえば、リシン残基上の第一アミン基のビオチニル化に予想外に敏感である。超ビオチニル化GDF-8は、アミン特異性ビオチニル化試薬でビオチニル化される場合、ビオチンのないGDF-8と比較して活性が低いか、または不活性化されている。ビオチニル化後の機能的、成熟GDF-8タンパク質を保持するために、アミン基上の成熟GDF-8調製物中に組み入れられるビオチンの量は重要であることが判明した。たとえば、MYO-029およびActRIIB結合活性は、超ビオチニル化調製物において減少する。したがって、GDF-8ダイマー1モルあたり5モル未満のビオチンを有するアミンビオチニル化成熟GDF-8調製物が好ましい。別の実施態様において、タンパク質をスルフヒドリル、カルボキシル、および/または炭水化物上でビオチニル化することができる。光活性化に際して非特異的に結合するか、または反応する光反応性ビオチン化合物も利用できる。

40

## 【0075】

本発明において提供されるある方法において、GDF-8は、潜在複合体としてアミン特異性ビオチニル化試薬でビオチニル化され、その後、成熟GDF-8が複合体から単離される。これらの方法において、成熟GDF-8ダイマー中に組み入れられたビオチンは

50

、生物学的活性を保持するために、たとえば、レセプター結合部位の不活性化を回避するために最適化される。GDF-8タンパク質は、スルフヒドリル特異性ビオチニル化試薬を用いて、表面システイン残基（または表面チオール基）上でビオチニル化することもできる。さらに、たとえば、反応性アルデヒドを生成するための酸化的前処理およびビオチンヒドラジド試薬の使用を含む、炭水化物をビオチニル化する方法は、当該分野において公知であり、本明細書において記載されるタンパク質、たとえば成熟GDF-8タンパク質であって、最適には修飾された形態であるものについて最適化することができる。さらに、たとえば、アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩残基によるビオチニル化を可能にするカルボキシル反応性ビオチニル化試薬および反応を使用できる。当業者には明らかのように、ビオチンのGDF-8ダイマーに対する最適モル比は、使用されるビオチニル化手順および試薬によって変わるであろう。たとえば、当業者は、少なくとも1つのGDF-8活性を保持しつつ、異なる、ビオチンのGDF-8に対する最適モル比を有するビオチニル化成熟GDF-8タンパク質を生成するために、本明細書において記載された方法を公知ビオチニル化手順と組み合わせて使用して、活性なビオチニル化GDF-8調製物を最適化する方法を理解するであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0076】

さまざまなビオチニル化試薬が、GDF-8潜在複合体をはじめとするタンパク質を有効に標識化することができる。反応におけるビオチン誘導体のGDF-8潜在複合体に対するモル比は、約10、15、20、40、または80：1であり、試薬組成および濃縮反応時間、および温度は、反応中に組み入れられるビオチンの量を調節するために変えることができる。たとえば、塩および他の薬剤を任意に最適化することができる。ある実施態様において、成熟GDF-8ダイマーをGDF-8のアミノ末端プロペプチド部分と関連してビオチニル化して、ビオチニル化反応の間の成熟ダイマーの不活性化を回避する。ビオチン誘導体はよく知られており、当該分野において入手可能である。ビオチンの修飾は、様々なスパーサーアーム、溶解度に影響を及ぼす修飾、および/または反応性基を含み、たとえば、ビオチン部分の開裂を可能にする。ビオチンのスクシンイミジルエステルおよびその誘導体、たとえば、水溶性スルホスクシンイミジルエステルを、たとえば、リシン残基上のGDF-8のビオチニル化に使用できる。たとえば、組み入れられたビオチンの量を定量するために、周知のアッセイおよびサイジング技術、たとえば、逆相高圧液体クロマトグラフィー、質量アッセイなどが使用される。さらに、たとえば、比色アッセイまたは蛍光アッセイによる市販のビオチン定量キットを利用できる（たとえば、EZ<sup>T</sup><sub>M</sub> Biotin Quantitation Kit、Pierce、HABA（2-（4'-ヒドロキシアゾベンゼン）-安息香酸）を利用）。

#### 【0077】

さらなるビオチニル化法の例は、たとえば、GDF-8潜在複合体を、1モルのGDF-8複合体に対して15または20モルのEZ-link Sulfo-NHS-Biotin（Pierce）の比で2時間、2～8でビオチニル化することを含む（たとえば、米国特許公開番号2004/0142382 A1の実施例3参照）。0.5% TFAを用いてpHを下げるにより反応を停止することができ、その後、複合体をおよびC4 Jupiter 250 x 4.6 mmカラム（Phenomenex）上クロマトグラフィーに付して、成熟GDF-8をGDF-8プロペプチドから分離する。TFA/CH<sub>3</sub>CN勾配で溶出されたビオチニル化成熟GDF-8フラクションをプールし、濃縮し、MicroBCA<sup>T</sup><sub>M</sub>タンパク質アッセイ試薬キット（Pierce）によるか、または他の周知の単離および濃縮技術を用いて定量する。

#### 【0078】

好ましい実施態様において、インビトロ結合アッセイは、ビオチニル化GDF-8タンパク質捕捉剤を含み、GDF-8タンパク質は、ビオチン部分の反応容器の表面上のアビジンとの相互作用により、反応容器の表面と接触する。いくつかの実施態様において、ビオチン部分の成熟GDF-8タンパク質に対するモル比は、ビオチニル化成熟GDF-8タンパク質において、約0.5：1から約4：1の間である。他の実施態様において、ビ

オチンの G D F - 8 ダイマーに対する平均比は、約 5 : 1 未満、約 2 : 1 未満、または約 1 : 1 未満である。ビオチンの成熟 G D F - 8 タンパク質に対する比は、活性な G D F - 8 調製物において、0 : 3 のモル比の混合物であると測定され、分子の大部分は約 1 : 1 である。いくつかの実施態様において、ビオチニル化成熟 G D F - 8 調製物は、成熟 G D F - 8 ダイマー 1 モルあたり約 1、2、3、4、または 5 モル未満のビオチンを含む。ビオチンの成熟 G D F - 8 タンパク質に対する平均または中央比は、たとえば、約 0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8、または 9、あるいはこの値より少ない。ビオチンの成熟 G D F - 8 タンパク質に対する比についてのモードは、たとえば、約 1、2、3、4、または 5、あるいはこの値より少ない。他の検出および捕捉剤もビオチニル化により標識することができる。たとえば、ビオチニル化 M Y O - 0 2 9 は、たとえば、少なくとも 10 : 1、20 : 1 (または未満)、またはそれ以上の比までビオチニル化することができる。好ましい実施態様において、ビオチニル化成熟 G D F - 8 タンパク質調製物の平均モル比は、1 モルの成熟 G D F - 8 ダイマーに対して約 1 から 3 モルの間のビオチンである。任意に、別の捕捉剤を使用することができる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 9 】**

一つの実施態様において、ビオチニル化 M Y O - 0 2 9 は、反応容器、たとえば、96 穴プレートの表面上に固定化された M Y O - 0 2 9 と結合する抗 - M Y O - 0 2 9 抗体を検出するための検出剤である。同様に、フォリスタチン、さまざまな G D F - 8 結合レセプター、アクチビン、または G D F - 8 プロペプチドに対する抗体を検出するための E L I S A は、これらの物質およびそのそれぞれのビオチニル化体を M Y O - 0 2 9 およびビオチニル化 M Y O - 0 2 9 と置換することにより、これらの方法に含まれる。加えて、G D F - 8 の阻害剤に対して形成される抗体を認識し、結合することができる任意の試薬を、使用可能な用量反応性シグナルを生成させるために単独で使用されるか、または他の試薬との組み合わせにおいて使用されるかにかかわらず、G D F - 8 の阻害剤に対する抗体を検出するために使用できる。これらの試薬を直接結合アッセイ様式 (特に、ヒト以外の起源のサンプルについて) または競合的様式 (以下に記載) において用いることができる。

**【 0 0 8 0 】**

さらなる実施態様において、検出剤は、これもまた G D F - 8 調節剤と特異的に結合する (架橋) ことにより複合体を形成する抗体と特異的に結合することにより、複合体形成する。この架橋アッセイは、検体抗体の多価性により可能になる。ある実施態様において、サンプル中の標的抗体の存在または不在あるいはその含量は、標識活性を測定することにより評価され、これは、検出剤の標識化において用いられる標識剤に依存する。

**【 0 0 8 1 】**

いくつかの実施態様において、「直接」標識は、補助試薬を添加せずに検出可能なシグナルを自発的に生成できる特異的結合メンバーと結合または接合する任意の分子である。いくつかの例は、放射性同位元素 (たとえば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ )、重金属、フルオロフォア (たとえば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、フルオレセイン イソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、1 - N - (2, 2, 6, 6 - テトラメチル - 1 - オキシル - 4 - ピペリジル) - 5 - N - (アスパルテート) - 2, 4 - ジニトロベンゼン)、色素 (たとえば、フィコシアニン、フィコエリトリン、テキサスレッド、o - フタルアルデヒド)、発光分子、たとえば、化学発光および生物発光分子、コロイド状金粒子、コロイド状銀粒子、他のコロイド状金属粒子、ヨーロピウム、ポリスチレン色素粒子、着色微粒子、たとえば、染料ゾル、および着色ラテックス粒子を包含する。多くのこのような物質は当業者に周知である。

**【 0 0 8 2 】**

ある場合において、標識は、酵素、たとえば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ (たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、グルコースオキシダーゼ、または - ガラクトシダーゼであってよい。様々な実施態様において、特異的酵素とともに使用され

る基質は、対応する酵素の存在下での、色、蛍光、または発光における検出可能な変化の生成について選択される。酵素は、グルタルアルデヒドまたは還元的アミノ化架橋により G D F - 8 調節剤と接合させることができる。しかしながら、容易に認識されるように、様々な異なる接合技術が存在し、当業者には容易に利用可能である。

#### 【 0 0 8 3 】

特定の実施態様において、ビオチニル化および/または酵素標識検出剤、たとえば、抗体を G D F - 8 調節剤/抗体複合体に添加して、結合させる。過剰の試薬を洗い流し、適切な基体を含有する溶液を次いで反応容器に添加する。基質は酵素触媒反応を受け、その結果、分光光度アッセイにより測定可能な変化が起こり、この変化はサンプル中に存在する抗体の量を示す。

10

#### 【 0 0 8 4 】

ペルオキシダーゼは、可溶性基質（たとえば、3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジン ( T M B )、o - フェニレンジアミン ( O P D )、2, 2' - アジノ - ジ [ 3 - エチル - ベンズチアゾリン ] スルホネート ( A B T S )、パラニトロフェニルホスフェート、ルミノール、ポリフェノール、アクリジンエステル、およびルシフェリン) とともにインキュベートされた場合、前記基質において分光的に検出可能な発色または発光性変化をもたらす。典型的には、基質との一定のインキュベーション期間の後、反応をクエンチし（たとえば、酸性化による）、光学密度（吸光度）または発光を測定することにより結果を定量する。吸光度結果を発色反応の直線範囲における O D 値と比較することができ、発光免疫学的検定を相対的光単位 ( R L U ) で測定する。さらなる代替案として、結合および実用的な用量反応シグナルを生成させる試薬の任意の組み合わせを使用できる（たとえば、放射性標識剤、酵素/基質試薬、またはビオチン/アビジンを利用した検出増幅系）。

20

#### 【 0 0 8 5 】

さらなる他の態様において、標識は、ビオチン、ハプテン、またはエピトープ標識（たとえば、ヒスチジン - タグ、H A - タグ（ヘマグルチニンペプチド）、マルトース結合タンパク質、A v i T a g（登録商標）、またはグルタチオン - S - トランスフェラーゼ）であり、これは、G D F - 8 調節剤複合体と結合した標識と相互作用する標識された検出剤の添加により検出できる。ビオチン - 標識（ビオチニル化）検出剤は、続いて前記アビジン - 酵素複合体および好適な発色または蛍光性基質とともにインキュベーションした後、そのアビジン - 酵素、たとえば、アビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼの複合体との相互作用により検出できる。特定の実施態様において、ビオチニル化 G D F - 8 調節剤は、ヨーロピウムで標識されたストレプトアビジンでも検出できる。

30

#### 【 0 0 8 6 】

ある実施態様の工程 ( d ) において、反応容器の表面と結合した G D F - 8 調節剤/抗体複合体は、標識のシグナルの定性的または定量的評価により検出される。数例において、標識は直接、たとえば、蛍光または発光により、あるいは基質の添加により間接的に測定される。他の例において、標識は追加の試薬とともにインキュベーションした後測定される。標識がビオチンである実施態様において、アビジン複合体（たとえば、いくつかの好ましい実施態様において、西洋ワサビペルオキシダーゼ）をその後の工程で添加することができる。一つの実施態様において、アビジン複合体は固定化された検出剤と結合できる。過剰のアビジン複合体は洗い流される。酵素の基質を次に添加し、その結果、たとえば、色、蛍光、または発光において測定可能な変化が生じる。いくつかの実施態様において、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジンである。

40

#### 【 0 0 8 7 】

工程 ( c ) および ( d ) における検出剤は、いくつかの実施態様において（たとえば、図 1 において示される実施態様において）、第二の標識された G D F - 8 調節剤である。G D F - 8 調節剤は、G D F - 8 と特異的に結合する抗体、G D F - 8 結合パートナーと特異的に結合する抗体、G D F - 8 レセプター、A c t R I I B タンパク質、フォリスタチンドメイン含有タンパク質、フォリスタチンタンパク質、G A S P - 1 タンパク質、G

50

D F - 8 タンパク質、G D F - 8 プロペプチド、非タンパク質様阻害剤、および小分子をはじめとする抗体であり得る。いくつかの実施態様において、検出剤は、最初に反応容器の表面上にある未標識 G D F - 8 調節剤と同じ G D F - 8 調節剤である。好ましい実施態様において、G D F - 8 調節剤は M Y O - 0 2 9 である。

【 0 0 8 8 】

ある実施態様において、本発明の方法は、フォリスタチン、さまざまな G D F - 8 結合レセプター、アクチビン、G D F - 8 プロペプチド、または生体サンプル中の他の G D F - 8 調節剤と特異的に結合する生体サンプル中の抗体の検出を可能にする。他の実施態様において、この方法は、個体からの生体サンプルにおける、投与された G D F - 8 調節剤に対する抗体の検出を可能にする。

10

【 0 0 8 9 】

工程 ( c ) および ( d ) における検出剤は、いくつかの実施態様において (たとえば、図 2 において示されるように)、検出剤で標識された G D F - 8 である。いくつかの好ましい実施態様において、検出剤はビオチンを含む。本発明の方法は、フォリスタチンと特異的に結合する生体サンプル中の抗体、さまざまな G D F - 8 結合レセプター、アクチビン、G D F - 8 プロペプチド、または生体サンプル中の他の G D F - 8 調節剤の検出も包含する。他の実施態様において、この方法は、個体からの生体サンプルにおける投与された治療用 G D F - 8 調節タンパク質の検出を可能にする。

【 0 0 9 0 】

本発明は、第一 G D F - 8 阻害剤に対する個体の免疫応答を評価する方法を提供し、この方法は：( a ) 第一 G D F - 8 阻害剤を反応容器の表面と接触させ；( b ) 反応容器に生体サンプルを添加し；( c ) 標識された第二 G D F - 8 阻害剤を反応容器に添加し；( d ) 前記表面と結合した、標識された第二 G D F - 8 阻害剤 / 抗体複合体を検出する工程を含み、ここにおいて、標識された複合体の検出は、第一 G D F - 8 阻害剤に対する免疫応答を示す。いくつかの好ましい実施態様において、第一 G D F - 8 阻害剤は M Y O - 0 2 9 である。いくつかの好ましい実施態様において、第二の G D F - 8 阻害剤は M Y O - 0 2 9 である。

20

【 0 0 9 1 】

さらに、G D F - 8 調節剤に対する個体の免疫応答を評価する方法が提供される。一つの実施態様において、第一 G D F - 8 阻害剤に対する個体の免疫応答を評価する方法は：( a ) G D F - 8 阻害剤を反応容器の表面と接触させ；( b ) 生体サンプルを反応容器に添加し；( c ) 標識された G D F - 8 タンパク質を反応容器に添加し；( d ) 試験サンプル中の表面と結合した、標識された G D F - 8 タンパク質の量を対照サンプルと比較することを含み、ここにおいて、標識された複合体の減少したレベルが検出されることは、G D F - 8 阻害剤に対する免疫応答を示す。いくつかの好ましい実施態様において、第一 G D F - 8 阻害剤は M Y O - 0 2 9 である。

30

【 0 0 9 2 】

レポーター遺伝子アッセイ

他の実施態様において、インビトロアッセイはレポーター遺伝子アッセイ ( R G A ) (たとえば、Thies et al.、Growth Factors 18 : 251 - 259 ( 2001 ) 参照) である。ある実施態様において、R G A は：( a ) 反応容器中にレポーター遺伝子構造を含む宿主細胞を提供する工程 (ここにおいて、前記構造は、G D F - 8 - 反応性制御エレメントおよびレポーター遺伝子を含む)；( b ) レポーター遺伝子の発現を活性化するために十分な量の成熟 G D F - 8 タンパク質を容器に添加する工程；( c ) レポーター遺伝子の G D F - 8 活性化を調節するために十分な量の G D F - 8 調節剤を工程 ( b ) の容器に添加する工程；( d ) 生体サンプルを反応容器に添加する工程；および ( e ) 生体サンプルの存在下および不在下で細胞においてレポーター遺伝子発現を検出する工程を含む。いくつかの実施態様において、方法は、レポーター遺伝子の存在下で、色、発光、または蛍光を変える基質を添加するさらなる工程をさらに含む。

40

【 0 0 9 3 】

50

宿主細胞は、ヒト、哺乳動物 または他の動物からの真核細胞であってよい。好ましい実施態様において、宿主細胞は細胞系、たとえば、真核細胞系、哺乳動物細胞系、または癌細胞系、たとえば、横紋筋肉腫細胞系である。レポーター遺伝子構造は、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどをはじめとする当該分野において公知の任意の手段により、一時的に、または安定的に宿主細胞中に導入することができる。レポーター遺伝子構造は、GDF-8-反応性制御エレメント、たとえば、プロモーターおよび/またはエンハンサー配列、および前記制御エレメントと操作により結合したレポーター遺伝子（たとえば、酵素などの検出剤を発現できるもの）を含む（たとえば、米国特許公開番号2003/0138422、および前記特許において記載されている参考文献を参照）。好ましい実施態様において、酵素は、たとえば、比色分析、蛍光、または発光分子への基質の変換を触媒し、レポーター遺伝子発現の量は、前記のように、基質の検出可能な生成物への変換を測定することにより測定される。

10

#### 【0094】

たとえば、GDF-8の活性を示すために、ルシフェラーゼを発現するレポーターベクターpGL3(CAGA)<sub>12</sub>を使用するレポーター遺伝子アッセイ(RGA)が開発された。アッセイに添加されたGDF-8タンパク質の量を最適化のために滴定することができる。最大レポーター構造活性化の40%、50%、60%、70%、80%、または90%を生じさせるために十分なGDF-8タンパク質の量が選択される。GDF-8タンパク質は、たとえば、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500、または1,000 ng/mLで添加される。一定量のGDF-8タンパク質を使用して、GDF-8調節剤を滴定して、GDF-8活性の調節の滴定を準備することができる。たとえば、GDF-8調節剤（たとえば、MYO-029）は、たとえば、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500、または1,000 ng/mLから選択される濃度で試験することができる。好ましい実施態様において、GDF-8調節剤滴定は、アッセイにおける阻害の直線的範囲に及ぶ。GDF-8調節剤の生体活性を阻害する抗体を特定するために、GDF-8タンパク質活性を、たとえば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%阻害するために十分な量の薬剤が反応に添加される。GDF-8タンパク質による活性の少なくとも約50%阻害をもたらすMYO-029の量が選択され、生体サンプルが反応中に滴定される。任意に、GDF-8シグナルを約80%阻害するMYO-029量を選択してもよい。たとえば、サンプル中の抗体の、レポーター遺伝子アッセイにおけるGDF-8調節剤の効果を克服する能力を特定するために、生体サンプルを次に1以上の量で添加することができる。好ましい実施態様において、薬剤は、アッセイに添加される前に、試験サンプルとともにプレインキュベートされる。添加される生体サンプルの量を変えるために、たとえば、約1:4、1:5、1:8、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、および/または1:50の希釈度が用いられる。任意に、生体サンプルは前記のように濃縮または分画することができる。

20

30

#### 【0095】

細胞を次いで、10 ng/mL GDF-8の有無両方で、たとえば、グルタミン、ストレプトマイシン、ペニシリン、および1 mg/mLウシ血清アルブミンを含むMcCoyの5A培地中試験生体サンプルの有無両方で、6時間37°Cで処理する。ある実施態様において、GDF-8調節剤対照は、約10 pM~50 μMの濃度を用いて平行して実験される。濃度の例は、10 pM、50 pM、100 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、1 μM、5 μM、10 μM、および50 μMのGDF-8調節剤を包含する。好ましい実施態様において、試験サンプル中のGDF-8調節剤の量を、既知量の薬剤の対照滴定と比較し、かくして定量化する。ルシフェラーゼは、周知の技術を用いて処理された細胞において定量することができる。別法として、GDF-8調節剤に対して反応性であるレポーター構造であって、任意にルシフェラーゼ以外の検出マーカーを含んでもよいものを用いることができる。

40

50

## 【0096】

本開示は、標的 G D F - 8 調節剤と結合できる抗体を検出するための好ましい実施態様について言及しているが、本発明の方法を用いて様々な標的物質に対する抗体を検出できると理解される。同様に、本発明の開示は、診断用または治療用生成物のインビボ投与に関連したヒトにおけるアンチグロブリン産生の検出および/またはモニタリングに関するが、この方法は他の用途および種における使用にも適用できると理解される。

## 【0097】

実施例

## 【実施例 1】

## 【0098】

ピオチニル化 M Y O - 0 2 9 で M Y O - 0 2 9 に対する抗体を検出するためのアッセイ G D F - 8 調節剤、たとえば、M Y O - 0 2 9 に対する免疫応答のキャラクタライゼーションにおいて、3つのアッセイ：スクリーニング、滴定、および特異性アッセイを行うことができる。陽性の結果（たとえば、M Y O - 0 2 9 に対する免疫応答の検出）を確認するためのプロトコルは、まず、スクリーニングアッセイ様式において全てのサンプルを試験することを含む。カットポイントよりも低い O D を生成するスクリーニング陰性サンプルは、陰性として記載され、さらに試験されない。スクリーニング陽性サンプル、すなわち、カットポイント以上の O D を生成するサンプルは続いて滴定および特異性アッセイにおいて試験される。

## 【0099】

1つの抗 - M Y O - 0 2 9 抗体酵素免疫測定法 ( E L I S A ) は、スクリーニング、滴定および特異性アッセイのために開発された具体例である。この実施態様は、中和 G D F - 8 調節剤抗体 M Y O - 0 2 9 に対する抗体を検出するために設計された架橋アッセイである。抗 - M Y O - 0 2 9 抗体 E L I S A 法は、ラット、サル、マウス、ウサギ、およびヒト血清サンプルについて行われてきた。このアッセイにおいて、M Y O - 0 2 9 をマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させる。ピオチニル化 M Y O - 0 2 9 を希釈された血清サンプルとともに同時インキュベートして、G D F - 8 調節剤特異的免疫グロブリンを吸着された M Y O - 0 2 9 およびピオチニル化された M Y O - 0 2 9 間で架橋させ、アッセイに添加する。架橋したピオチニル化 M Y O - 0 2 9 は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) ペルオキシダーゼ基質が添加されると、プレートのウェル中に着色溶液を生成するアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) 複合体により検出される。各ウェルの O D は、結合したピオチニル化 M Y O - 0 2 9 の量に正比例し、分光光度アッセイにより決定される。

## 【0100】

正および負の対照を各プレートで実験して、アッセイ性能をモニターする。サンプルの O D をプレートのカットポイント O D と比較して、M Y O - 0 2 9 について特異的な抗体が存在するかどうかを究明する。カットポイント O D は、負の対照 O D の平均の 2 倍として定義される。ヒトおよびウサギ血清について、カットポイント 1 / O D は、負の対照の 1 / O D ( 正常なヒトまたは正常なウサギ血清であって、それぞれ 1 : 8 に希釈されたもの ) の平均の 1 . 2 倍として定義される。サンプルをまず、1 : 8 および 1 : 1 6 の希釈度でスクリーニング様式において試験する。カットポイント以上の O D を生成する任意のサンプルを滴定様式 ( サンプルを 1 : 8 から出発して 1 : 2 に連続的に希釈 ) において再アッセイして、力価を得る。抗体価は、カットポイント O D と等しい O D を生成するサンプルの希釈度の逆数として定義される。この力価の対数を記載する。正の結果を特定し、M Y O - 0 2 9 の抗体の特異性を確認するために、特異性アッセイを行うことができる。滴定様式において陽性であるサンプルを、M Y O - 0 2 9 でコーティングされていないプレート ( コーティング緩衝液のみをウェルに添加 ) 上での E L I S A において試験する。

## 【0101】

滴定様式において陽性であり、特異性様式において陰性であるサンプルは、次のガイドラインに従って抗 - M Y O - 0 2 9 抗体について陽性であると確認される：1) スクリー

10

20

30

40

50

ニング陰性サンプルは、陰性であると記載され、さらに試験されない；2)スクリーニング陽性サンプルは、続いて滴定および特異性ELISAにおいて試験される；3)滴定陽性サンプルの最終サンプル結果は、特異性試験結果に依存する；4)特異性陰性サンプルは陽性(下記参照)であると見なされ、一方、特異性陽性サンプルは、特異性結果の大きさによって陽性であり得る。

【実施例2】

【0102】

バイオニル化MYO-029を有するMYO-029に対する抗体についてスクリーンのためのアッセイ法

生体サンプルをまず、この実施例において記載されるスクリーニングアッセイ様式において試験する。98穴マイクロタイターELISAプレート(高結合、Costar)の各ウェルを、ウェルあたり100  $\mu$ lのコーティング溶液(100 mM重炭酸塩緩衝液中0.5  $\mu$ g/mL MYO-029、pH 9.6)でサンプルアッセイの前日にコーティングした。プレートをフィルムで覆い、2~8 で一夜(16-20時間)インキュベートした。翌日、プレートを、自動プレート洗浄機を用い、300  $\mu$ l/ウェルのTHST洗浄緩衝液(50 mM Tris-HCl、pH 8.0、1.0 mMグリシン、0.5 M NaCl、および0.05% (v/v) Tween 20(登録商標)を含有)で2回洗浄した。

10

【0103】

ブロッキング緩衝液(DulbeccoのPBS + 4% (w/v)脱脂粉乳；各ウェルあたり200  $\mu$ l)を次いで添加し、プレートを密封フィルムで覆い、室温で1.5~3.0時間インキュベートした。プレートを次いで洗浄緩衝液(300  $\mu$ l/ウェル)で4回洗浄し、2回目の洗浄後、プレートを反転させた。洗浄されたプレートをその後直ちにアッセイにおいて使用するか、または密封し、2~8 で、第1日をブロッキングの日として、最高4日まで保存した。

20

【0104】

ヒト血清サンプルを室温で解凍し、よく混合した。まず、PBST(DulbeccoのPBS + 0.05% (w/v) Tween 20(登録商標))中1:25の希釈、次にPBST+4% (v/v)正常ヒト血清中で1:3希釈を行った。サンプル溶液(50  $\mu$ l/ウェル)をプレートウェルに重複して移した。バイオニル化MYO-029(実施例12参照)をプレートウェルのそれぞれに添加した(50  $\mu$ l/ウェル)。(正および負の対照は、次の実施例においてさらに説明する。)プレートをプレート密封フィルムで覆い、プレートシェーカー上で2時間 $\pm$ 10分間、室温でインキュベートした。プレートを次いで300  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転した。

30

【0105】

PBSTで最終希釈度1:50,000(100  $\mu$ l/ウェル)に希釈されたアビジンD-HRP(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を次いでプレートウェルのそれぞれに添加した。プレートを覆い、プレートシェーカー上、室温で1時間 $\pm$ 10分間インキュベートした。プレートを次いで洗浄緩衝液(300  $\mu$ l/ウェル)で6回洗浄し、3回目の洗浄後、プレートを反転させた。

40

【0106】

室温で、西洋ワサビペルオキシダーゼ基質TMB(BioFX Laboratories (Randallstown, MD))の溶液を次いで、プレートの各ウェルに添加した(100  $\mu$ l/ウェル)。プレートを暗所、室温で約12 $\pm$ 1分間インキュベートした後、0.18 M硫酸(100  $\mu$ l/ウェル)をプレートのウェルに基質添加と同じ順序で添加することにより反応をクエンチした。

【0107】

450 nmの波長でのサンプルのODを、プレートのカットポイントODと比較し、MYO-029に対して特異的な抗体が存在するかどうかを究明した。カットポイントO

50

Dは1:25に希釈された正常なヒト血清である負の対照の平均の1.5倍として定義される。450nmでの吸光度を、反応のクエンチ後30分以内で、Molecular Devices Spectra Max 250プレートリーダーで測定した。

【0108】

アッセイのために、負の対照の平均ODは<0.150である。平均対照値は、実施例7の式を用いて、プレートカットポイントOD値に基づいて決定される(カットポイントは、負の対照ODの平均×1.5として定義される)。

【0109】

スクリーニング陰性サンプルであって、カットポイントよりも低いODを生成するサンプルは、陰性として記載され、対数力価<1.40であり、さらに試験されない。スクリーニング陽性サンプル(カットポイント以上のODを生成するサンプル)は、その後、滴定および特異性検定において試験される。

10

【実施例3】

【0110】

対照

負の対照

概論 - - プールされた正常ヒト血清(たとえば、Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY)から入手)を負の対照として使用した。室温で血清をPBSTで1:25に希釈することにより、負の対照溶液を実験当日に調製した。

【0111】

アッセイ内変動 - - 負の対照溶液のODおよびカットポイント値のアッセイ内変動(CV)を、各プレート上の16の複製ウェルのアッセイにより決定した。試験の3日を評価した。各プレートについて得られたデータを、内部アッセイ精度結果を得るために独立してアッセイした。1、2、および3日から得られたカットポイント値の平均は、それぞれ0.087、0.077、および0.072である。対応するCV値は18.7、6.4、および3.7%である。負の対照OD値のCV(1プレートあたり16回複製)は2.2%から13.3%の間の範囲であった。

20

【0112】

アッセイ間変動 - - 負の対照溶液のODおよびカットポイント値のアッセイ間変動を決定した。平均カットポイントODおよび対応するCD値は、それぞれ0.089および25.0%であることが判明した。負の対照の平均ODおよび対応するCV値は、それぞれ0.060および25.0%であることが判明した。各プレート上の負の対照の16OD複製のCV値は2.2%から13.3%の間の範囲であった。

30

【0113】

正の対照

概論 - - 親和性精製ヤギ抗ヒトIgG抗体(KPL, Gaithersburg, MD)をMYO-029架橋ELISAアッセイの正の対照として使用した。1mgのヤギ抗ヒトIgGを0.5mL精製水および0.5mLグリセロールの混合物中で水和することにより、正の対照ストック溶液を実験当日に調製した。ストック溶液をPBS + 0.1% BSA中500 ng/mL、またはPBS + 0.1% BSA中500 ng/mLに希釈した。

40

【0114】

希釈ライブラリー - - 正の対照溶液について、希釈ライブラリー試験を行った。まず1:25、1:75、1:225、1:675、および1:2025の正の対照の出発希釈度で5つの試験溶液を調製した。結果から、試験された5つの正の対照滴定について計算できる力価の全ての間のCVは1.6%であることが示された。試験において検出される非直線性の傾向はなかった。

【0115】

アッセイ内変動 - - 正の対照溶液のODおよび力値値についてアッセイ内変動を決定した。正の対照を同じプレート上で複数回試験した(内部アッセイ)。各プレートはそれぞ

50

れ5つの個々の正の対照滴定を含有していた。1日に合計4プレート、2日に2プレート、3日に4プレートを用いて試験を行った。アッセイ内変動を3つの別個の日で評価した。各プレートについて得られた値を、アッセイ内精度結果を得る順序と独立してアッセイした。

【0116】

1日ごとに試験された全てのプレートから得られたデータを用いて、正の対照の最大ODおよび力価のプレート間変動を決定した。力価対数について得られたアッセイ内(プレート内)CV値は2.2%以内であった。1、2、および3日に試験された全てのプレート全体についての個々の正の対照の力価の対数を用いて得られたCV値はそれぞれ12.4、1.7、および1.5%であった。1、2、および3日の試験された全プレートの正の対照により得られた最大ODについて得られたCV値は、それぞれ18.9、2.8、および3.2%であった。

10

【0117】

4プレート全体の正の対照の各希釈度でのOD値の平均SDおよびCVをアッセイ内評価の3日についてアッセイした。CV値は2.8%から4.7%の範囲であった。正の対照滴定の滴定アッセイを行った。prozone効果の証拠はなかった。

【0118】

アッセイ間変動 - - 正の対照OD値および力価のランダムなアッセイ間変動を決定するために、対照溶液を6日にわたって20プレートについてアッセイした。各プレートについて、最終データアッセイの間、正の対照の1組の重複試験(各プレート上の同じ位置)を使用した。正の対照溶液について、平均力価対数および対数力価CV値は、それぞれ3.37および6.6%であった。平均最大ODおよび最大OD CV値はそれぞれ2.137および11.9%であった。

20

【0119】

処方 - - 正の対照希釈標準ストック溶液(500ng/mL)を評価のために0.1%BSAを含む脱イオン水中でまず調製した。妥当性検証実験はすべて、脱イオン水+0.1%BSA中で調製された希釈標準ストック溶液を用いて行った。PBSが所望の希釈剤であるので、正の対照希釈標準ストック溶液を次いで0.1%BSAを有するPBS中で調製した。同じプレート実験で2つの異なるストック溶液から調製された正の対照をアッセイすることにより、両溶液の対数力価および最大ODの比較を行った。正の対照の対数力価において有意な差は観察されなかった(データは省略)。最大ODおよび力価(数値)の差は、アッセイ変動の範囲内と見なすことができる。希釈標準ストック溶液は、PBS+0.1%BSA中で調製され、-70°Cで最高1年まで保存される。

30

【実施例4】

【0120】

未暴露集団における反応性

実施例1の手順を用いて、ODの統計的分散をアッセイし、統計に基づくアッセイカットポイント値を決定するために、25の個々の正常血清サンプルを3日にわたって3回試験した(n=75結果)。

【0121】

3日にわたってアッセイされた25サンプルのサンプルODの平均値は0.058であり、これは同じプレート上でアッセイされた負の対照の平均OD値と同じである。このことは、負の対照性能は、正常な個々のサンプル性能の代表例であり、プレート間のカットポイントODを標準化するために使用できることを示す。したがって、個々のプレートのカットポイントは、プレートの負の対照平均ODに、25の正常サンプルの推定95パーセントに基づいて導かれる倍数nをかけることにより計算できる。

40

【0122】

95%の母数によらない概算は、OD値の得られた集団をアッセイし、値(0.081)の95%含むために十分高いODを決定することによりなされた。サンプルの平均の95%と負の対照ODの比は1.39であった。この評価は短期間(連続3日)にわたり試

50

験された限定されたサンプル組を使用して行われたので、複数の場所から集められ、長期間にわたってアッセイされる臨床試験サンプルの性能における変動はさらに広範囲であると予想される。実験の予想されるさらに高い変動を考慮して、また簡便のために、プレートカット値の計算に用いられる倍数  $n$  を 1.39 から 1.5 に丸めた。

【実施例 5】

【0123】

アッセイ感度

正の対照溶液を調製するために親和性精製ヤギ抗ヒト IgG を使用した。よって、アッセイの感度を当初の正の対照試薬濃度およびその力価に基づいて計算した。アッセイにおいて、正の対照試薬の出発濃度は、500 ng/mL であった。PBS + 0.1% BSA 中で調製された正の対照溶液について行われた評価の間に得られた平均力価値は 4680 であった。アッセイ感度は次の式：

$$\text{感度} = \frac{\text{正の対照溶液の出発濃度}}{\text{負の対照の力価数}}$$

を用いて 107 pg/mL (500 ng/mL / 4680) であると決定された。

【実施例 6】

【0124】

薬剤干渉の試験

正の対照溶液 (1:25) を様々な量の MYO-029 でスパイクして、0.01、0.1、1.0、および 10 μg/mL の最終薬剤濃度を得た後、PBST 中で 3 倍希釈した (1:75、1:225、1:675、1:2025、1:6075、1:18225、および 1:54675)。力価および最大 OD を表 2 に示す。

【0125】

【表 2】

表 2

アッセイ条件	力価の対数	力価の対数の差 (%)	最大 OD	最大 OD の差 (%)
スパイク無し	3.12		2.460	
0.01 μg/mL MYO-029 でスパイク	2.83	-9.3	1.194	-51.5
0.1 μg/mL MYO-029 でスパイク	2.16	-30.8	0.189	-92.3
1.0 μg/mL MYO-029 でスパイク	<1.40	NA	0.079	-96.8
10 μg/mL MYO-029 でスパイク	<1.40	NA	0.061	-97.5

結果は、正の対照の性能は 0.1 μg/mL 以上のサンプル中の MYO-029 の濃度で有意に影響を受けることを示した。最大 OD における減少が、0.01 μg/mL 濃度の MYO-029 について観察された。抗体応答の不均一性のために、サンプルにおいて見られる MYO-029 の干渉は、正の対照について検出される干渉と異なり得る。

【実施例 7】

【0126】

滴定アッセイ

サンプルをまずスクリーニング様式において 1:25 および 1:75 の希釈度で試験した。カットポイント以上の OD を生成する任意のサンプルを滴定および特異性アッセイにおいて再アッセイする (もしカットポイント以上の OD を生成するサンプルが投与後サンプルであるならば、対応する投与前サンプルとともに)。サンプルの滴定および特異性アッセイは、同時に、または連続して行うことができる。抗体価を得るために、サンプルをまず 1:25 に希釈し、次いで連続して、PBST + 4% ヒト血清で 1:25 から 1:3 に希釈して、1:54, 675 の希釈度を得る。各サンプルを重複してアッセイする。アッセイは本質的に実施例 2 に記載されるようにして行われる。

【0127】

所定のサンプルの力価は、カットポイントと等しいOD値を生成するサンプルの希釈度の逆数として定義される。以下の式1を用いた内挿により力価数を計算し、式中、ODcpはカットポイントODであり、OD1は希釈系列におけるカットポイントODより高いサンプルOD値であり、OD2は希釈系列におけるカットポイントODより低いサンプルOD値であり、DilnOD1はサンプルのOD1での希釈度の逆数であり、DilnOD2はサンプルのOD2での希釈度の逆数である。

【数1】

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

10

【0128】

力価数の対数値を最終結果として記載する。

【数2】

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

【0129】

たとえば、以下の表3に示されるラット血清サンプルのアッセイにおいて、ODcp = 0.252、DilnOD1 = 675、DilnOD2 = 2025、未知サンプルの力価の対数は3.29である。Watson LIMSシステムを用いて未

20

【0130】

【表3】

表3

正の対照 (PC)		平均 PC	負の対照 (NC)		平均 NC	未知 サンプル		U n k 平均
2.974	2.882	2.928	0.121	0.122	0.126	1.684	1.678	1.681
1.402	1.400	1.401	0.129	0.129		1.665	1.678	1.672
0.610	0.676	0.643	0.129	0.132		1.150	1.149	1.150
0.330	0.334	0.332	0.120	0.130		0.440	0.506	0.473
0.209	0.197	0.203	0.116	0.128		0.258	0.216	0.237
0.164	0.197	0.181	0.125	0.119		0.187	0.148	0.168
0.151	0.146	0.148	0.126	0.120		0.144	0.121	0.132
0.140	0.153	0.147	0.131	0.141		0.139	0.133	0.136

30

【実施例8】

【0131】

特異性アッセイ

サンプルをまずスクリーニング様式において、1:25および1:75の希釈度で試験した。正のサンプルを試験した。MYO-029の抗体の特異性を確認するために、スクリーニングまたは滴定様式において陽性であるサンプルを、MYO-029でコーティングされていないプレート(コーティング緩衝液のみをウェルに添加)上で試験する。

40

【0132】

サンプルを連続してPBST+4%ヒト血清で1:25から1:3に希釈して、1:54, 675の希釈度を得る。各サンプルを重複してアッセイする。アッセイは実施例1において記載されたようにして行われる。96穴マイクロタイターELISAプレート(Costar)の各ウェルを各ウェルあたり100μlのコーティング緩衝液(100mM重炭酸塩緩衝液、pH 9.6)でサンプルアッセイ前の日にコーティングした。プレートを密封フィルムで覆い、2~8で一夜(16~20時間)インキュベートした。翌日

50

、プレートに300  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液で、自動プレート洗浄機を用いて2回洗浄した。

【0133】

ブロッキング緩衝液 (Dulbecco's PBS + 4% (w/v) 脱脂粉乳; 200  $\mu$ l/ウェル) を次いで添加し、プレートを密封フィルムで覆い、室温で1.5 ~ 3.0時間インキュベートした。プレートを次いで洗浄緩衝液 (300  $\mu$ l/ウェル) で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。洗浄されたプレートをその後、アッセイにおいて直ちに使用するか、または1日をブロッキングの日として、2~8で最高4日まで保存した。

【0134】

サンプルを室温で解凍し、よく混合した。PBST (DulbeccoのPBS + 0.05% (w/v) Tween 20) 中1:25の初期希釈度、その後のPBST + 4% (v/v) 正常ヒト血清中1:3の希釈度を調製した。ピオチニル化MYO-029をプレートウェル (50  $\mu$ l/ウェル) のそれぞれに重複して添加した。(正および負の対照は以下の実施例においてさらに説明する。) サンプル溶液 (50  $\mu$ l/ウェル) を重複してプレートウェルに移した。プレートを密封フィルムで覆い、プレートシェーカー上、2時間±10分間、室温でインキュベートした。プレートを次いで300  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。

【0135】

アビジンD-HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 溶液 (100  $\mu$ l/ウェル) を次いでプレートウェルのそれぞれに添加した。プレートを覆い、プレートシェーカー上、室温で1時間±10分間インキュベートした。プレートを次いで洗浄緩衝液 (300  $\mu$ l/ウェル) で6回洗浄し、3回目の洗浄後にプレートを反転させた。

【0136】

室温で、西洋ワサビペルオキシダーゼ基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB基質; BioFX Laboratories (Randallstown, MD)) の溶液を次いでプレートの各ウェルに添加した (100  $\mu$ l/ウェル)。プレートを暗所、室温で約12±1分間インキュベートした後、0.18 M硫酸 (100  $\mu$ l/ウェル) を基質添加と同じ順序でプレートウェルのそれぞれに添加することにより、反応をクエンチした。

【0137】

サンプルのODをプレートのカットポイントODと比較し、滴定アッセイから得られたシグナルがMYO-029について特異的な抗体を検出するかどうかを究明した。カットポイントODは負の対照の平均の1.5倍として定義される。450nmでの吸光度を反応のクエンチ後30分以内に測定した。

【0138】

滴定 - 陽性のサンプルの最終サンプル結果は、特異性結果に依存する (たとえば、特異性 - 陰性のサンプルは陽性に見なされる)。滴定様式において陽性であり、特異性様式において陰性であるサンプルは、抗-MYO-029抗体について陽性であると確認される。特異性陽性サンプルは、特異性結果の大きさに応じて陽性に見なされるか、または見なされない。

【実施例9】

【0139】

サンプル評価

滴定および特異性アッセイ結果を次の表に基づいて評価する。滴定アッセイの繰り返しがもとの結果と一致しない結果を生じる場合、初期設定は当初の結果である。

【0140】

10

20

30

40

【表 4】

表 4. サンプル評価

スクリーンの結果 (Log力価)	力価の結果 (Log力価)	再アッセイによる力価の結果 (Log力価)	対応する特異性のプレート結果 (Log力価)	報告された結果 (Log力価)	
< 1.40	NA	NA	NA	陰性 (< 1.40)	
≥ 1.40 で、 ≤ 1.88	< 1.40	NA	NA	陰性 (< 1.40)	
		NA	< 1.40	陽性 (TR)	
			≥ 1.40で、TRがSRよりも ≥ 0.48で上	陽性 (TR)	
	≥ 1.40 で、ScR よりも < 0.48 で上	< 1.40	≥ 1.40で、TRがSRよりも < 0.48で上	陰性 (< 1.40)	
			< 1.40	陽性 (TR)	
			≥ 1.40で、TRがSRよりも ≥ 0.48で上	陽性 (TR)	
	繰り返し力 価 アッセイ	≥ 1.40	≥ 1.40で、TRがSRよりも < 0.48で上	陰性 (< 1.40)	
			< 1.40	陽性 (RTR)	
			≥ 1.40で、RTRがSRよりも ≥ 0.48で上	陽性 (RTR)	
> 1.88	< 1.40	< 1.40	NA	陰性 (< 1.40)	
		繰り返し力 価 アッセイ	≥ 1.40	< 1.40	陽性 (RTR)
			≥ 1.40	≥ 1.40で、RTRがSRよりも ≥ 0.48で上	陽性 (RTR)
	繰り返し力 価 アッセイ	≥ 1.40	≥ 1.40で、RTRがSRよりも < 0.48で上	陰性 (< 1.40)	
			NA	< 1.40	陽性 (TR)
			NA	≥ 1.40で、TRがSRよりも ≥ 0.48で上	陽性 (TR)
				≥ 1.40で、TRがSRよりも < 0.48で上	陰性 (< 1.40)

NA = 不適當 ScR = スクリーニングの結果 TR = 力価の結果 RTR = 再アッセイによる力価の結果 SR = 特異性アッセイの結果

## 【 0 1 4 1 】

MYO-029に対する抗体が対象中に存在するかどうかの究明は、投与前および投与後サンプル結果の比較に基づいて行われる。投与前サンプルが陰性であり、対応する投与後サンプルが陽性であるならば、対象は免疫応答に対して陽性であると見なされる。投与前および投与後サンプルがどちらも陽性であるならば、対象は、投与後サンプル力価が、対応する投与前サンプルについて測定された力価値よりも少なくとも1希釈度(3倍)高い場合に、免疫応答について陽性であると言われる。

## 【 実施例 1 0 】

10

20

30

40

50

## 【0142】

ビオチニル化GDF-8でのMYO-029に対する抗体の検出

ビオチニル化GDF-8のMYO-029に対する結合を阻害する抗体を検出するために、96穴マイクロタイターELISAプレート(Costar)の各ウェルを、各ウェルあたり100 $\mu$ lのコートング溶液(100 mM重炭酸塩緩衝液中6 $\mu$ g/mL MYO-029、pH 9.6)で、サンプルアッセイの前の日にコートングした。別法として、0.5  $\mu$ g/mLのMYO-029を使用した。プレートを密封フィルムで覆い、2~8 で一夜(16~22時間)インキュベートした。翌日、プレートを、300  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液で、自動プレート洗浄機を用いて2回洗浄した。

## 【0143】

ブロッキング緩衝液(DulbeccoのPBS+1%(w/v)ウシ血清アルブミン; 250 $\mu$ l/ウェル)を次いで添加し、プレートを密封フィルムで覆い、室温で1.5~3.0時間インキュベートした。プレートを次いで300 $\mu$ l/ウェルのTHST洗浄緩衝液(50mM Tris-HCl、pH 8.0、1.0 mMグリシン、0.5 M NaCl、および0.05%(v/v) Tween 20(登録商標)を含有)で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。洗浄されたプレートをその後、アッセイにおいて直ちに使用するか、または1日をブロッキングの日と定めて、2~8 で最高4日まで保存した。

## 【0144】

サンプルを室温で解凍し、よく混合した。THST中1:8の初期希釈、その後THST中で1:2希釈を行った。サンプル溶液(100  $\mu$ l/ウェル)をプレートウェルに重複して移した。別法として、PBST(Dulbecco's PBS 0.05% w/v Tween 20)中1:25の初期サンプル希釈、続いて1:3希釈を行い、50  $\mu$ l/ウェルを移した。

## 【0145】

正の対照ストック溶液(ウサギ抗-MYO-029抗血清、正常ヒト血清中に1:6.25希釈度でスパイク)を解凍し、THST中1:8に希釈した。2倍の連続希釈をその後、12.5%のプールされた正常ヒト血清を含有するTHST中で行い、次の正の対照希釈の組を得た:1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024。正の対照溶液(100  $\mu$ l/ウェル)をプレートウェルに重複して移した。プレートを密封フィルムで覆い、プレートシェーカー上で2時間 $\pm$ 10分間、室温でインキュベートした。プレートを次いで300  $\mu$ l/ウェルTHST緩衝液で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。

## 【0146】

ビオチニル化GDF-8(実施例12参照)を次いでプレートウェルのそれぞれに添加した(100  $\mu$ l/ウェルの35ng/mL溶液)。プレートをプレート密封フィルムで覆い、プレートシェーカー上、1.5時間 $\pm$ 10分間室温でインキュベートした。プレートを300 $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。

## 【0147】

アビジン-HRP(Pierce, Rockford, IL)溶液(100  $\mu$ L/ウェル)をつぎにプレートウェルのそれぞれに添加した。アビジンD-HRP(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を代わりに使用した。プレートを覆い、プレートシェーカー上、室温で40分間または1時間インキュベートした。プレートを次いで洗浄緩衝液(300  $\mu$ L/ウェル)で4回洗浄し、2回目の洗浄後にプレートを反転させた。

## 【0148】

室温で、ペルオキシダーゼ基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB基質; BioFX Laboratories, Randallstown, MD)をプレートの各ウェルに添加した(100  $\mu$ l/ウェル)。プレートを暗所、室温で約1

10

20

30

40

50

0 分間インキュベートした後、0.18 M 硫酸 (100 μl / ウェル) を基質添加と同じ順序でプレートウェルのそれぞれに添加することにより、反応をクエンチした。光学密度を 450 nm で分光光度計 (Molecular Devices、Sunnyvale、CA) でクエンチの 30 分以内に読み取り、OD をアッセイ用に 1 / OD に変換した。

【実施例 11】

【0149】

力価の測定およびデータアッセイ

前記スクリーニングアッセイ (実施例 10) において陽性であるサンプルについて、サンプルを THST 中 1 : 2 に希釈し、続いて、12.5% のプールされた正常ヒト血清を含有する THST 中 7 回 1 : 8 に連続希釈して、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128、1 : 256、1 : 512、および 1 : 1024 の最終希釈度を得た。所定のサンプルの力価は、カットポイントに等しい 1 / OD 値を生成するサンプルの希釈度の逆数として定義される。アッセイのカットポイントは負の対照の 1 / OD 値の平均の 1.2 倍として定義され；正常な個人から得られる血清サンプルのパネルにおいて観察される 1 / OD 値の 95% に基づく。力価数は、以下の式を用いた内挿により計算され、式中、OD<sub>cp</sub> はカットポイント OD であり、OD<sub>1</sub> は希釈系列におけるカットポイント OD よりも高い OD 値であり、OD<sub>2</sub> は希釈系列におけるカットポイント OD より低い OD 値であり、Diln<sub>OD1</sub> は OD<sub>1</sub> でのサンプル希釈度の逆数であり、および Diln<sub>OD2</sub> は OD<sub>2</sub> でのサンプル希釈度の逆数である。

10

20

【数 3】

$$[\text{力価}] = \left[ \text{Diln}_{1/\text{OD}1} - \left( \left( \frac{1/\text{OD}1 - 1/\text{OD}_{cp}}{1/\text{OD}1 - 1/\text{OD}2} \right) * (\text{Diln}_{1/\text{OD}1} - \text{Diln}_{1/\text{OD}2}) \right) \right]$$

【0150】

滴定および特異性アッセイ結果を、次の表を用いて評価した。滴定アッセイの繰り返しもとの結果と一致しない結果をもたらす場合、初期設定は当初の結果である。

【0151】

【表 5】

表 5

スクリーンの結果 (Log力価)	力価の結果 (Log力価)	再アッセイによる力価の結果 (Log力価)	対応する特異性のプレート結果 (Log力価)	報告された結果 (Log力価)	
< 0.903	NA	NA	NA	陰性 (< 0.903)	
≥ 0.903 で、 ≤ 1.50	< 0.903	NA	NA	陰性 (< 0.903)	
		≥ 0.903 で、ScR よりも < 0.60 で上	NA	< 0.903	陽性 (TR)
		≥ 0.903 で、ScR よりも ≥ 0.60 で上	< 0.903	≥ 0.903で、TRがSRよりも ≥ 0.60で上	陽性 (TR)
	繰り返し力 価 アッセイ	≥ 0.903	< 0.903	≥ 0.903で、TRがSRよりも ≥ 0.60で上	陰性 (< 0.903)
			≥ 0.903	≥ 1.50で、RTRがSRよりも ≥ 0.60で上	陽性 (RTR)
			≥ 0.903	≥ 1.50で、RTRがSRよりも < 0.60で上	陰性 (< 0.903)
		< 0.903	NA	陰性 (< 0.903)	
	> 1.50	繰り返し力 価 アッセイ	≥ 0.903	< 1.40	陽性 (RTR)
			≥ 0.903	≥ 0.903で、RTRがSRよりも ≥ 0.60で上	陽性 (RTR)
			≥ 0.903	≥ 0.903で、RTRがSRよりも < 0.60で上	陰性 (< 0.903)
≥ 0.903		NA	< 0.903	陽性 (TR)	
		NA	≥ 0.903で、TRがSRよりも ≥ 0.60で上	陽性 (TR)	
		NA	≥ 0.903で、TRがSRよりも < 0.60で上	陰性 (< 0.903)	

NA =不適當 ScR = スクリーニングの結果 TR =力価の結果 RTR =再アッセイによる力価の結果 SR = 特異性アッセイの結果

10

20

30

40

50

## 【実施例 1 2】

## 【0 1 5 2】

## ビオチニル化

GDF-8を次のようにしてビオチニル化した。完全長GDF-8をfed-batch CHO細胞培養バイオリクタープロセスにおいて発現させ、GDF-8の潜在複合体形態を提供した。正常フロー微細孔濾過、次いで濃縮、および接線流限外濾過を用いて透析を用いて細胞培養収穫物を清澄化した。この濃縮プールを次いでNi<sup>2+</sup>-NTA固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) にかけて、ここで、GDF-8複合体が捕捉される。50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300 mM NaCl、20-500 mM イミダゾール直線勾配で5カラム容積にわたって溶出が起こった。得られたビー

クは次いで、透析による緩衝液交換を受け、I M A C - 由来のイミダゾールの除去およびビオチニル化反応のために適切な緩衝液の導入が可能になる。

【0153】

潜在複合体調製物を次いでビオチニル化した。14 : 1の標的スルホ - NHS - LC - ビオチン対GDF - 8複合体モル比を反応において使用した。たとえば、10 : 1、15 : 1、および20 : 1の試薬対基質比も試験した。固体ビオチン試薬 (EZ - link Sulfo - NHS - ビオチン、Pierce Biotechnology) をジメチルスルホキシド (DMSO) 中に200 g / Lで溶解させた後、GDF - 8複合体サンプルに添加した。反応を、100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、150 mM NaCl、pH 7.2中1.5 g / L未満の複合体濃度、4 で、120分間行った。反応混合物を穏やかに反応の開始時に混合し、反応の経過中は光を遮断した。0.5% (v / v) エタノールアミンまたは5.0% (v / v) 1 M Trisを添加することにより、反応を停止させた。

10

【0154】

このビオチニル化GDF - 8複合体を次いで、低pH、高カオトロブ濃度緩衝液 (6000 mM尿素、300 mM NaCl、50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、pH = 2.5) 中への透析により緩衝液交換した。複合体の解離が低pHでプロトン化とともに起こった。この緩衝液において、複合体は解離し、プロペプチドおよび成熟ダイマー中に可溶化する。さらに、遊離ビオチンが透析の間に除去される。この濃縮プールを次いで高性能サイズ排除クロマトグラフィーにかけ、ここで、GDF - 8の成熟ダイマー形態がプロペプチドおよび残存モノマーから分離される。

20

【0155】

GDF - 8のビオチニル化、成熟ダイマー形態を含むこのフラクションを次にブチル高性能逆相クロマトグラフィー上で、0 - 90% (v / v) CH<sub>3</sub>CN、0.1% (v / v) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H、pH = 2.0直線状勾配を5カラム容積にわたって使用して、さらに処理した。この工程からのピークを、低pH処方緩衝液 (0.1% (v / v) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H、pH = 2.0) 中への透析により緩衝液交換した。

【0156】

ビオチニル化成熟GDF - 8ダイマーを、機能、たとえば、結合およびレポーター遺伝子アッセイにおけるその活性の保持について評価した。ビオチニル化成熟GDF - 8タンパク質を逆相高性能液体クロマトグラフィー / エレクトロスプレー - イオン化四極子飛行時間質量アッセイ (RP - HPLC / ESI - QTOF - MS) により測定し、調製物は約0 ~ 3のモル比の混合物を含有し、分子の大部分は1 : 1であった。さらに高い標的モル比は、当該分野において周知の条件の調節により、9 : 1もの高い測定値をもたらした。

30

【0157】

MYO - 029は同様のアッセイ法を用いてビオチニル化され、以下に記載される方法において用いることができる。本質的に、単離されたMYO - 029を希釈し、緩衝液交換し、次いでビオチニル化する。反応および保存条件は、いくつかのパラメータを除いて、GDF - 8と同じである。MYO - 029濃度値は10 ~ 24 g / Lの範囲である。ビオチニル化反応における標的スルホ - NHS - LC - ビオチン対MYO - 029モル比は40 : 1であり、これは8 ~ 11のモル比測定値をもたらす。これは、アビジン : HABA A<sub>600</sub> nm分光光度アッセイ (ImmunoPure アビジンおよびHABA、Pierce) により測定される。透析を用いて、試薬を次いで低塩、中性pH処方緩衝液 (137 mM NaCl、1 mM KCl、8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH = 7.2) 中へ緩衝液交換する。

40

【実施例13】

【0158】

レポーター遺伝子アッセイ

GDF - 8調節剤と特異的に結合する抗体は、GDF - 8の生物活性についての細胞に

50

基づくレポーター遺伝子アッセイ (RGA) において検出される。GDF-8 調節剤の活性を阻害する抗体、たとえば、MYO-029 活性を中和する抗体が次のアッセイにより検出される。

【0159】

ヒト横紋筋肉腫細胞系 A204 pCAGA を使用し、ここにおいて、A204 (ATCC HTB-82) は、周知の技術を用いて、レポーター遺伝子構造物、pGL3 (CAGA)<sub>1,2</sub> (米国特許公開番号 2003/0138422 A1 および 2004/0142382 A1 において記載) で安定的にトランスフェクトされた。別法として、FuGENE-TM-6 トランスフェクション試薬 (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて、A204 細胞を pGL3 (CAGA)<sub>1,2</sub> で一時的にトランスフェクトする。トランスフェクション後、細胞を、96 穴プレート上、2 mM グルタミン、100 U/mL ストレプトマイシン、100 µg/mL ペニシリンおよび 10% ウシ胎仔血清で補足された McCoy の 5A 培地中で 16 時間培養した。細胞を、対照について、一定量 (75 ng/mL) の成熟 GDF-8 タンパク質、一定量 (400 ng/mL) の MYO-029 および グルタミン、ストレプトマイシン、ペニシリン、および 10% ウシ胎仔牛血清を含む McCoy の 5A 培地中の希釈系列の正の対照の有無両方で、37 °C で 6 時間処理した。任意に最大ルシフェラーゼシグナルの約 80% をもたらず GDF-8 の量を選択してもよい。MYO-029 を 6.25 ng/mL ~ 400 ng/mL (5.9 nM ~ 375 nM) の濃度で GDF-8 とともに 1 時間、室温でプレインキュベートし、次いでタンパク質を RGA 中に添加する。GDF-8 調節剤に対する正の対照抗体を MYO-029 とともにインキュベートし、RGA においてアッセイした。任意に、GDF-8 シグナルを約 80% 阻害する MYO-029 の量を選択してもよい。Luciferase Assay System (Promega) を用いて処理された細胞においてルシフェラーゼを定量した。このアッセイにおいて、75 ng/mL の GDF-8 は 80% 活性化をもたらし、一方、400 ng/mL の MYO-029 はレポーター遺伝子構造物の 80% 阻害をもたらす。

【0160】

平行反応において、細胞を、75 ng/mL の成熟 GDF-8 タンパク質の有無両方で、MYO-029 (または他の GDF-8 調節剤) の有無両方で、および試験生体サンプルの有無両方で処理する。ヒト血清は、MYO-029 処理を受けた個体から得られ、緩衝液中、1:5、1:10、1:15、1:20、および 1:40 に希釈される。1:10 より低い希釈について、試験サンプル血清を、10% ヒト血清を含有する緩衝液 (Bioreclamation, Inc.) 中でさらに希釈する。

【0161】

機能的細胞に基づくアッセイを、次のような公開された GDF-8 反応性レポーター遺伝子アッセイ (米国特許公開番号 2003/0138422 A1) に基づいて行った: このアッセイにおいて、75 ng/mL の GDF-8 を 400 ng/mL の MYO-029 (375 nM) とともにプレインキュベートし、pGL3 (pCAGA)<sub>1,2</sub> 細胞とともに、ヒト血清サンプルの存在下および不在下で移された A204 細胞に添加した。ヒト血清サンプルを 1:20 に希釈し、たとえば 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、および 1:6400 に希釈されたウサギ抗 MYO-029 ポリクローナル血清を含む正の対照と比較した。アッセイは、ヒト血清サンプルまたは正の対照ウサギ抗体を MYO-029、次いで GDF-8 と混合し、RGA における細胞に直接添加するか、あるいはヒト血清サンプルまたは正の対照ウサギ抗体を MYO-029 とともに 1 時間プレインキュベートし、RGA における細胞に添加し、次いで GDF-8 をサンプルウェルに添加するかのいずれかで行うことができる。

【0162】

MYO-029 に対する中和抗体の正の対照を次のようにして作成した。ウサギを無傷 MYO-029 または MYO-029 結合部位を含む MYO-029 タンパク質フラグメントで免疫化した。このヒト抗体の定常領域に対する、ウサギにおける強力な免疫応答の

10

20

30

40

50

生成を回避するために、消化を行って、M Y O - 0 2 9 抗体の F c 部分を除去した。2 匹のウサギを無傷または消化された M Y O - 0 2 9 のいずれかで免疫化した。リガンド結合アッセイを用いて、中和活性について血液を試験した。4 匹はすべて良好な抗体価結果を示し、対照ウサギ血清は全 4 匹からの血液をプールすることにより得た。

【 0 1 6 3 】

本開示において記載される刊行物、特許、および生物学的配列は、全体として本発明の一部として参照される。参考に組み入れられる物質が本明細書と矛盾するか、または一致しない範囲で、本明細書はこのような物質に優先する。本明細書における文献の記載は、このような文献が本発明の先行技術であることを承認するものではない。

【 0 1 6 4 】

特に反対の記載がない限り、請求の範囲を包含する本明細書において用いられる成分、細胞培養物、処理条件などの量を表す全ての数値は、「約」なる用語により全ての場合において修飾されると理解される。従って、特に反対の記載がない限り、数値パラメータは近似値であり、本発明が得ようとする所望の特性に応じて変わるであろう。特に反対の記載がない限り、一連の要素の前の「少なくとも」は、この一連の数値における全ての要素について言及すると理解される。当業者らは、常用の実験程度のものを使用して、本明細書において記載される本発明の具体例と等価な多くのものを認識または説明することができる。このような同等物も以下の請求の範囲に含まれることが意図される。

【 0 1 6 5 】

本明細書内の具体例は、本発明の実施態様を説明し、本発明の範囲を限定すると理解すべきではない。当業者らは、多くの他の実施形態が本発明に含まれることを容易に認識する。本発明の他の実施形態は、本明細書において開示された明細および実施を考慮することから当業者には明らかになるであろう。明細書および実施例は、例示のみとして見なされ、本発明の真の範囲および精神は請求の範囲により示されることが意図される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 6 6 】

【 図 1 】本発明の方法の一実施態様を示し、ここで、G D F - 8 調節剤は M Y O - 0 2 9 であり、検出剤はビオチニル化 M Y O - 0 2 9 である。

【 0 1 6 7 】

【 図 2 】本発明の方法の一実施態様を示し、ここで、G D F - 8 調節剤は M Y O - 0 2 9 であり、検出剤はビオチニル化 G D F - 8 である。

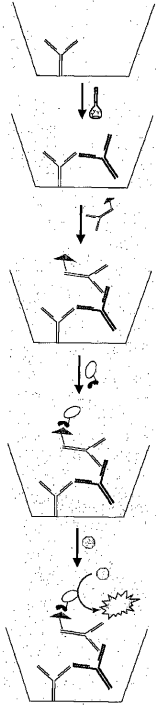
10

20

30

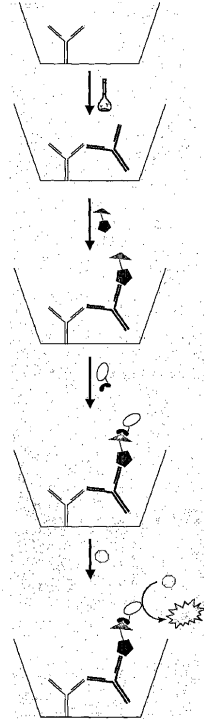
【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2



【 配 列 表 】

2008537777000001.xml

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 19 年 11 月 20 日 (2007.11.20)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2008537777000001.app

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/010711

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. GOIN33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with Indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/072715 A2 (WYETH CORP [US]; HILL JENNIFER J [US]; WOLFMAN NEIL M [US]) 4 September 2003 (2003-09-04) cited in the application Abstract; examples 10 and 11.  ----- -/-	1,2,8, 16-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  28 February 2007		Date of mailing of the international search report  09/03/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  LOPEZ GARCIA, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/010711

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WHITTEMORE L-A ET AL: "Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 300, no. 4, 24 January 2003 (2003-01-24), pages 965-971, XP002281006 ISSN: 0006-291X cited in the application Abstract; p. 966, col. 1 "Direct binding assay", col. 2 "Competition ELISA"; Fig. 1.	1,2,8, 11,12, 16-18
X	WO 2004/037861 A2 (WYETH CORP [US]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; VELDMAN GEERTRUIDA M [U]) 6 May 2004 (2004-05-06) cited in the application  Abstract; Examples 3, 5, 6 and 9.	1-12, 16-19, 22-27, 54-57, 60-63
X	WO 03/027248 A2 (WYETH CORP [US]; DUNHAM WILLIAM J LM; WOLFMAN NEIL M [US]; VELDMAN GEE) 3 April 2003 (2003-04-03) cited in the application Abstract; examples 4 and 6.	1-12, 16-19, 22-27
X	WO 00/43781 A2 (METAMORPHIX INC [US]; TOPOUZIS STAVROS [US]; WRIGHT JILL F [US]; RATOV) 27 July 2000 (2000-07-27) cited in the application Abstract; p. 78, l. 22.	1,2,9, 16-19
A	WO 02/068650 A2 (WYETH CORP [US]) 6 September 2002 (2002-09-06) cited in the application Abstract; examples 5-7.	1-66
X	WO 00/77206 A2 (ABBOTT LAB [US]) 21 December 2000 (2000-12-21) Abstract; example 3; p. 3, l. 9-p. 5, 27	1,2,8, 16-19
A	WO 2004/009770 A (UNIV CALIFORNIA [US]; WHISTLER JENNIFER L [US]) 29 January 2004 (2004-01-29) Abstract; p. 49ff; p. 56 "Polypeptide-based assay".	1-66
A	WO 99/06559 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED [US]; LEE SE JIN [US]; MCPHERRON ALEXANDRA [US]) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application Abstract; p. 19 "Antibodies which bind to GDF receptors".	1-66

-/-

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No

PCT/US2006/010711

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90/06515 A (CENTOCOR INC [US]) 14 June 1990 (1990-06-14) Abstract; claim 5.	1-66

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/010711

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03072715	A2	04-09-2003	AU 2003217612 A1	09-09-2003
			CA 2476887 A1	04-09-2003
			EP 1572909 A2	14-09-2005
			JP 2005534616 T	17-11-2005
			MX PA04008150 A	17-06-2005
WO 2004037861	A2	06-05-2004	AR 047392 A1	18-01-2006
			AU 2003274448 A1	13-05-2004
			BR 0315598 A	06-09-2005
			CA 2500490 A1	06-05-2004
			CN 1788019 A	14-06-2006
			EP 1554312 A2	20-07-2005
			IS 7770 A	23-03-2005
			JP 2006519583 T	31-08-2006
			KR 20050049558 A	25-05-2005
			MX PA05004225 A	20-09-2005
			WO 03027248	A2
CA 2469230 A1	03-04-2003			
EP 1438068 A2	21-07-2004			
JP 2005510212 T	21-04-2005			
MX PA04002834 A	28-09-2005			
NZ 532034 A	30-06-2006			
WO 0043781	A2	27-07-2000	AT 322681 T	15-04-2006
			AU 772694 B2	06-05-2004
			AU 2514000 A	07-08-2000
			AU 2004203398 A1	19-08-2004
			BR 0008188 A	13-02-2002
			CA 2359242 A1	27-07-2000
			CN 1355881 A	26-06-2002
			DE 60027135 T2	11-01-2007
			EP 1147413 A2	24-10-2001
			HK 1041521 A1	17-11-2006
			JP 2003517580 T	27-05-2003
			MX PA01007366 A	04-06-2002
			NZ 513642 A	27-02-2004
			WO 02068650	A2
BR 0207110 A	16-08-2005			
CA 2437218 A1	06-09-2002			
EP 1397492 A2	17-03-2004			
JP 2005507637 T	24-03-2005			
JP 2006001938 A	05-01-2006			
MX PA03007063 A	15-10-2004			
NO 20033456 A	06-10-2003			
NZ 527286 A	30-11-2006			
ZA 200306064 A	22-02-2006			
WO 0077206	A2	21-12-2000		
			CA 2375820 A1	21-12-2000
			DE 60019586 D1	25-05-2005
			DE 60019586 T2	09-03-2006
			EP 1185649 A2	13-03-2002
			ES 2240108 T3	16-10-2005
			JP 2003528574 T	30-09-2003
			MX PA01012665 A	22-07-2002
			PT 1185649 T	31-08-2005

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/010711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0077206	A2	US 6284882 B1 US 2001049435 A1	04-09-2001 06-12-2001
WO 2004009770	A 29-01-2004	AU 2003252017 A1	09-02-2004
WO 9906559	A 11-02-1999	AU 8666398 A	22-02-1999
WO 9006515	A 14-06-1990	EP 0448632 A1 JP 4507285 T	02-10-1991 17-12-1992

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ジョン・エイ・ノーアク  
アメリカ合衆国 0 3 8 8 5 ニューハンブシャー州ストラサム、ウィリアム・サークル 1 1 番
- (72) 発明者 デニス・エム・オハラ  
アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州レディング、ジェア・ロード 8 番
- (72) 発明者 ジョン・ジー・クライアン  
アメリカ合衆国 0 1 5 4 5 マサチューセッツ州シュルーズベリー、ヒランド・ドライブ 5 3 番
- (72) 発明者 テレサ・エム・カイアツォ  
アメリカ合衆国 0 1 8 7 6 マサチューセッツ州テュークスベリー、ランカスター・ドライブ 1 6 0 番
- (72) 発明者 アリソン・ジョイス  
アメリカ合衆国 0 1 8 3 4 マサチューセッツ州グローブランド、センター・ストリート 6 1 番
- (72) 発明者 ジョゼフ・ダブリュー・ラジュースキー・ザ・サード  
アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州サウス・ボストン、ユニット 2 エル、エイチ・ストリート 3 4 - 3 6 番
- (72) 発明者 シュジュン・スン  
アメリカ合衆国 0 3 8 3 3 ニューハンブシャー州ブレントウッド、ピーボディ・ドライブ 4 3 番
- (72) 発明者 ニール・エム・ウルフマン  
アメリカ合衆国 0 2 0 3 0 マサチューセッツ州ドーバー、フィリップス・レイン 5 番
- F ターム(参考) 4C084 BA01 BA02 DB52 DB63 DB70 ZA94 ZA96 ZC21 ZC42  
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	检测对GDF-8调节剂的免疫应答		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008537777A</a>	公开(公告)日	2008-09-25
申请号	JP2008503211	申请日	2006-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	ジョンエイノーアク デニスエムオハラ ジョンジークライアン テレサエムカイアッツォ アリソンジョイス ジョゼフダブリューラジュースキーザサード シュジュンスン ニールエムウルフマン		
发明人	ジョン・エイ・ノーアク デニス・エム・オハラ ジョン・ジー・クライアン テレサ・エム・カイアッツォ アリソン・ジョイス ジョゼフ・ダブリュー・ラジュースキー・ザ・サード シュジュン・スン ニール・エム・ウルフマン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N33/74 G01N33/94		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.U A61K37/02 C07K14/47		
F-TERM分类号	4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/DB52 4C084/DB63 4C084/DB70 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZC21 4C084/ZC42 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/664643 2005-03-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本公开内容提供了用于检测生物样品中GDF-8调节剂(例如MYO-029)的抗体的方法。还包括检测对GDF-8调节剂的免疫应答的方法。特别地,提供了用于评估动物(包括人)中GDF-8调节剂(例如GDF-8抑制剂)的免疫应答的方法。

