

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 798**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007** **E 07842088 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2064239**

54 Título: **Anticuerpos anti-activina A y usos de éstos**

30 Prioridad:

08.09.2006 US 843430 P

17.08.2007 US 956653 P

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

12.02.2015

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks California 91320, US

72 Inventor/es:

HAN, HQ;
CHEN, QING;
KWAK, KEITH SOO-NYUNG y
ZHOU, XIAOLAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 798 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-activina A y usos de éstos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere generalmente a dominios de nudo de cisteína de activina A y agentes de unión a antígeno capaces de unirse a activina A o fragmentos de ésta.

Antecedentes de la invención

- 10 Muchos estados patológicos graves están acompañados de una afección denominada caquexia, que se refiere a la pérdida de masa celular corporal. La masa celular corporal (BCM) consiste en masa muscular, masa visceral y masa de células inmunes. BCM es el componente corporal más activo del cuerpo humano, representando el noventa y cinco por ciento de toda la actividad metabólica. Una pérdida del cinco por ciento en BCM da lugar a morbilidad cambiada, pérdida de fuerza muscular, metabolismo alterado y riesgo incrementado de infección. Una pérdida del cuarenta por ciento puede resultar en la muerte.

- 15 Los ejemplos de afecciones en las que la caquexia juega un papel para determinar el resultado de la enfermedad subyacente abarcan un rango de los problemas sanitarios principales actuales. En la caquexia reumatoide, los pacientes con artritis reumatoide (RA) pierden de trece a quince por ciento de BCM. Dos tercios de los pacientes con RA tienen caquexia, y esto resulta en una mortalidad de dos a cinco veces mayor. Otras afecciones relacionadas incluyen obesidad caquética reumatoide y caquexia hipercitocínica. La caquexia relacionada con el cáncer contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad, afectando también a la capacidad del paciente para tolerar terapias que potencialmente le salvarían la vida.

- 20 Los anticuerpos monoclonales dirigidos a Activina A fueron generados por Rabinovici et al (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1992). El anticuerpo se indujo frente al dímero de Activina A humana, para el que es específico. No se observó detección de monómeros disociados.

- 25 La subunidad beta A de inhibina de ovario se usó para inmunizar ratones. Los hibridomas aislados de los ratones inmunizados produjeron anticuerpos IgM e IgG2b. El último mostró unión y reactividad específicas para la subunidad beta A (Groome y Lawrence, Hybridoma, 1991).

Debido al papel común de activina A en varias enfermedades extendidas, todas las cuales tienen proporciones altas de mortalidad, existe una necesidad largamente anhelada en la técnica para composiciones y métodos para prevenir o revertir la caquexia relacionada con enfermedades. Dichas composiciones y métodos se proporcionan en la presente memoria.

Resumen breve de la invención

La patente objeto se refiere al anticuerpo inventivo o fragmento de unión a antígeno de éste, según la reivindicación independiente 1, y las reivindicaciones dependientes 2 a 12. Además, la patente proporciona una molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 12, un vector según la reivindicación 13 y 14, una célula aislada según las reivindicaciones 15 y 16, y a composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 17 a 20.

- 35 Además, la presente descripción proporciona una proteína de unión a antígeno aislada que comprende bien: a. una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: i. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones, y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias CDR3 de cadena ligera de L1-L14; ii. $X_{73} Q X_{74} X_{75} X_{76} X_{77} X_{78} X_{79} X_{80}$ (SEQ ID NO:132); iii. $L Q H N X_{81} Y X_{82} X_{83} T$ (SEQ ID NO:131); y iv. $Q A W D X_{84} S T X_{85} X_{86}$; b. una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: i. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones, y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias CDR3 de cadena pesada de H1-H14; ii. $X_{87} X_{88} X_{89} X_{90} X_{91} X_{92} X_{93} X_{94} F D Y$ (SEQ ID NO:187); iii. $X_{95} X_{96} X_{97} Y X_{98} D X_{99} X_{100} G W X_{101} X_{102} X_{103}$ (SEQ ID NO:188); iv. $X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109} Y X_{110}$ $X_{111} X_{112} X_{113} X_{114} X_{115} X_{116} X_{117} X_{118}$; o c. la secuencia CDR3 de cadena ligera de (a) y la secuencia CDR3 de cadena pesada de (b); en la que X_{73} es un residuo de metionina, un residuo de glutamina, o un residuo de arginina, X_{74} es un residuo de alanina, un residuo de tirosina, un residuo de glutamina, o un residuo de serina, X_{75} es un residuo de leucina, un residuo de tirosina, o un residuo de asparagina, X_{76} es un residuo de glutamina, un residuo de serina, o un residuo de treonina, X_{77} es un residuo de treonina, un residuo de tirosina, o un residuo de isoleucina, X_{78} es un residuo de prolina o un residuo de serina, X_{79} es un residuo de cisteína, un residuo de triptófano, un residuo de leucina, o un residuo de prolina, X_{80} es un residuo de serina o un residuo de treonina, X_{81} es un residuo de treonina o un residuo de serina, X_{82} es un residuo de prolina o un residuo de treonina, X_{83} es un residuo de fenilalanina o un residuo de triptófano, X_{84} es un residuo de arginina o un residuo de serina, X_{85} es un residuo de valina o un residuo de alanina, X_{86} es un residuo de valina o ningún residuo, X_{87} es un residuo de valina o ningún residuo, X_{88} es un residuo de glutamina o ningún residuo, X_{89} es un residuo de aspartato, un residuo de triptófano, o ningún residuo, X_{90} es un residuo de serina, un residuo de leucina, o ningún residuo, X_{91} es un residuo de isoleucina, un residuo de

glutamato, o un residuo de glutamina, X₉₂ es un residuo de alanina, un residuo de leucina, o un residuo de glicina, X₉₃ es un residuo de alanina o un residuo de leucina, X₉₄ es un residuo de prolina, un residuo de tirosina, o un residuo de glicina, X₉₅ es un residuo de aspartato o ningún residuo, X₉₆ es un residuo de glutamina o ningún residuo, X₉₇ es un residuo de aspartato o un residuo de alanina, X₉₈ es un residuo de tirosina o un residuo de glicina, X₉₉ es un residuo de serina o un residuo de tirosina, X₁₀₀ es un residuo de serina o un residuo de arginina, X₁₀₁ es un residuo de fenilalanina o ningún residuo, X₁₀₂ es un residuo de glicina o un residuo de aspartato, X₁₀₃ es un residuo de histidina o un residuo de prolina, X₁₀₄ es un residuo de glicina o ningún residuo, X₁₀₅ es un residuo de serina, un residuo de glutamato, o ningún residuo, X₁₀₆ es un residuo de arginina, un residuo de serina, o ningún residuo, X₁₀₇ es un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de serina, o un residuo de glutamina, X₁₀₈ es un residuo de serina, un residuo de arginina, o un residuo de triptófano, X₁₀₉ es un residuo de glicina, un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de leucina, X₁₁₀ es un residuo de serina, un residuo de glicina, un residuo de aspartato, o ningún residuo, X₁₁₁ es un residuo de serina, un residuo de valina, un residuo de asparagina, o un residuo de tirosina, X₁₁₂ es un residuo de serina, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de histidina, X₁₁₃ es un residuo de triptófano, un residuo de tirosina, o un residuo de glutamina, X₁₁₄ es un residuo de histidina, un residuo de aspartato, un residuo de tirosina, o ningún residuo, X₁₁₅ es un residuo de fenilalanina, un residuo de alanina, o un residuo de glicina, X₁₁₆ es un residuo de aspartato, un residuo de fenilalanina, un residuo de leucina, o un residuo de metionina, X₁₁₇ es un residuo de tirosina, o un residuo de aspartato, X₁₁₈ es un residuo de isoleucina, un residuo de valina, o ningún residuo, y la proteína de unión a antígeno se une específicamente a activina A humana.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En un aspecto adicional, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En un aspecto adicional, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En un aspecto adicional más, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR3 de cadena ligera de L1-L14; c. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y d. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14;

En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y c. una secuencia CDR3 de cadena pesada de H1-H14.

En un aspecto adicional más, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; y b. una secuencia CDR2 de cadena pesada de H1-H14.

- 5 En un aspecto adicional más, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia CDR1 de L1-L14.

La proteína de unión a antígeno aislada puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- a. una secuencia CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: i. (R/K)SSQS(L/I)L(H/Y)S(T/S)(G/N)(Y/N)(N/K)(-K)YL(D/V) (SEQ ID NO:115); ii. RA(S/G)QGI(S/R)N(D/N)L(-V/G); iii. RASQISISNYLNT; y iv. SG(D/E)K(L/W)G(D/E)K(F/Y)(A/V)(F/C) (SEQ ID NO:123); b. una secuencia CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: i. (H/Q/L)D(T/N/S)KRPS (SEQ ID NO:128); y ii. X₄₀ X₄₁ S X₄₂ X₄₃ X₄₄ S (SEQ ID NO:124), en el que X₄₀ es un residuo de alanina, un residuo de triptófano, o un residuo de leucina, X₄₁ es un residuo de treonina, un residuo de alanina, o un residuo de glicina, X₄₂ es un residuo de serina, un residuo de metionina, o un residuo de fenilalanina, X₄₃ es un residuo de leucina o un residuo de arginina, X₄₄ es un residuo de glutamina, un residuo de glutamato, o un residuo de alanina, c. una secuencia CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: i. GGS(I/F)(N/S)(S/A)(-G)(-G)(F/Y)YWS ; ii. GX₂₇ X₂₈ F X₂₉ X₃₀ Y X₃₁ X₃₂ X₃₃, en el que X₂₇ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina, X₂₈ es un residuo de treonina o un residuo de serina, X₂₉ es un residuo de treonina, un residuo de serina, o un residuo de isoleucina, X₃₀ es un residuo de glicina o un residuo de serina, X₃₁ es un residuo de tirosina, un residuo de glicina, o un residuo de triptófano, X₃₂ es un residuo de isoleucina o un residuo de metionina, X₃₃ es un residuo de histidina o un residuo de glicina; y iii. G(Y/F)TF(T/S)(-S/A)Y(G/W)(L/M/I)(S/H) (SEQ ID NO:140); d. una secuencia CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: i. (Y/E)I(S/Y/N)(Y/H)SG(S/G)T(Y/N)YNPSLK(S/R) (SEQ ID NO:142); ii. (V/N)/(K/W)(Y/Q)DGS(N/E/T)(K/E)Y(H/Y)(A/V)DSVKG; y iii. X₆₀ I X₆₁ X₆₂ X₆₃ X₆₄ X₆₅ X₆₆ T X₆₇ X₆₈ X₆₉ X₇₀ X₇₁ X₇₂ Q G (SEQ ID NO:180), en el que X₆₀ es un residuo de triptófano o un residuo de isoleucina, X₆₁ es un residuo de asparagina, un residuo de isoleucina, un residuo de serina, o un residuo de tirosina, X₆₂ es un residuo de prolina o un residuo de alanina, X₆₃ es un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de glicina, X₆₄ es un residuo de serina, un residuo de asparagina, o un residuo de aspartato, X₆₅ es un residuo de glicina o un residuo de serina, X₆₆ es un residuo de glicina, un residuo de asparagina, o un residuo de aspartato, X₆₇ es un residuo de asparagina o un residuo de arginina, X₆₈ es un residuo de tirosina o un residuo de serina, X₆₉ es un residuo de alanina o un residuo de serina, X₇₀ es un residuo de glutamina o un residuo de prolina, X₇₁ es un residuo de lisina o un residuo de serina, y X₇₂ es un residuo de fenilalanina o un residuo de leucina, en el que los símbolos de los residuos de aminoácidos en paréntesis identifican residuos alternativos para la misma posición en una secuencia.

En determinados aspectos, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones, y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

- 35 En aspectos adicionales, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de una adición, sustitución o delección de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En aspectos más adicionales, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada de H1-H14.

- 40 En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende dos secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

- 55 En un aspecto adicional, la proteína de unión a antígeno aislada comprende tres secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en

no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende cuatro secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende cinco secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En un aspecto adicional más, la proteína de unión a antígeno aislada comprende: a. una secuencia CDR1 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de seis adiciones, sustituciones, y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de L1-L14; b. una secuencia CDR2 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de L1-L14; c. una secuencia CDR3 de cadena ligera que se diferencia en no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de L1-L14; d. una secuencia CDR1 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de dos adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR1 de H1-H14; e. una secuencia CDR2 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cinco adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR2 de H1-H14; y f. una secuencia CDR3 de cadena pesada que se diferencia en no más de un total de cuatro adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia CDR3 de H1-H14.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende bien: a. un dominio variable de cadena ligera que comprende: i. una secuencia CDR1 de cadena ligera; ii. una secuencia CDR2 de cadena ligera; y iii. una secuencia CDR3 de cadena ligera; b. un dominio variable de cadena pesada que comprende: i. una secuencia CDR1 de cadena pesada; ii. una secuencia CDR2 de cadena pesada; y iii. una secuencia CDR3 de cadena pesada; o c. el dominio variable de cadena ligera de (a) y el dominio variable de cadena pesada de (b).

En una realización, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una combinación de un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo de combinaciones que consiste en: L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14.

En una realización, la proteína de unión a antígeno aislada comprende además: la secuencia constante de cadena ligera kappa de SEQ ID NO:84, 100 ó 108, y/o la secuencia constante de cadena pesada de SEQ ID NO:214, 215 ó 221.

En una realización, la proteína de unión a antígeno aislada, cuando se une a activina A: a. inhibe la activina A; b. compete de manera cruzada con un anticuerpo de referencia para la unión a activina A; c. se une al mismo epítipo de la activina A que dicho anticuerpo de referencia; d. se une a la activina A con sustancialmente la misma Kd que dicho anticuerpo de referencia; o e. se une a la activina A con sustancialmente la misma velocidad de disociación que dicho anticuerpo de referencia; en el que el anticuerpo de referencia comprende una combinación de secuencias de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada seleccionada del grupo de combinaciones que consiste en L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14.

En una realización, la proteína de unión a antígeno aislada, cuando se une a la activina A humana, inhibe la unión de la activina A al receptor de activina A humano; atenúa la caquexia en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en un modelo

animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa muscular corporal en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa grasa en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; y/o mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal con transfección de AAV-activina A.

- 5 En un aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende: a. un anticuerpo humano; b. un anticuerpo humanizado; c. un anticuerpo quimérico; d. un anticuerpo monoclonal; e. un anticuerpo policlonal; f. un anticuerpo recombinante; g. un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; h. un anticuerpo de cadena única; i. un fragmento divalente; j. un fragmento trivalente; k. un fragmento tetravalente; l. un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; n. un anticuerpo de dominio; o. un anticuerpo IgD; p. un anticuerpo IgE; q. un anticuerpo IgM; r. un anticuerpo IgG1; s. un anticuerpo IgG2; t. un anticuerpo IgG3; u. un anticuerpo IgG4; o v. un anticuerpo IgG4 que tiene al menos una mutación en una región bisagra que alivia una tendencia de formar enlaces disulfuro intracadena H.

También se proporciona una proteína de unión a antígeno humana específica para la activina A, en la que la proteína de unión a antígeno posee al menos una actividad biológica *in vivo* de un anticuerpo anti-activina A humana; tal como a atenuación de la caquexia.

- 15 Se proporciona además una proteína de unión a antígeno humana que mejora la pérdida de peso corporal en ratones que portan tumor de colon, o que mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno.

- También se proporciona una proteína de unión a antígeno humana que mejora la pérdida de masa muscular en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno, que mejora la pérdida de masa grasa en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno o que mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal con transfección de AAV-activina A.

Se proporciona además una proteína de unión a antígeno humana específica para la activina A, en el que la proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la activina A al receptor de activina A *in vitro*.

- 25 También se proporciona una proteína de unión a antígeno humana específica para la activina A, en el que la proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la activina A al receptor de activina A *in vivo*.

- En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera, la cadena pesada, o ambas, de una proteína de unión a antígeno de la invención; se describen además polinucleótidos que pueden comprender una secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193 ó 209 y/o una secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194 ó 210.

También se proporciona un plásmido que comprende el polinucleótido aislado; el plásmido puede ser un vector de expresión; y se proporciona una célula aislada que comprende el polinucleótido; la célula aislada puede ser un hibridoma, y la célula puede ser una célula CHO.

- 35 Se describe además un método para preparar una proteína de unión a antígeno que se une a la activina A humana, que comprende incubar la célula aislada en condiciones que la permitan expresar dicha proteína de unión a antígeno.

- También se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a antígeno de la invención, se describe un método para tratar una afección en un sujeto que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica, en el que la afección se puede tratar reduciendo la actividad de la activina A en dicho sujeto; el sujeto puede ser un ser humano, y la afección puede ser caquexia asociada con un tumor, en el que el tumor es un tumor gonadal, tal como cáncer de ovario, hiperplasia benigna de la próstata, neoplasia intraepitelial de la próstata, o cáncer de próstata, o en el que el tumor es cáncer de vejiga, tumor de Wilm, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de huesos, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer del cuello uterino, sarcoma sinovial, tumores que secretan péptido vasoactivo intestinal, glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer oral, leucoplaquia oral, cáncer anal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de huesos, o cáncer metastásico; la afección puede ser caquexia asociada con una artritis reumatoide; o la afección puede ser la necesidad de disminuir la actividad de la activina A en un sujeto.

- En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a los aminoácidos K13-Y39 de la activina A *in vitro* o *in vivo*. En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a los aminoácidos V82-N107 *in vitro* o *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona el cambio en masa muscular para ratones con artritis inducida por colágeno tratados con anticuerpo anti-activina A A1.

La Figura 2 proporciona el cambio en masa grasa para ratones con artritis inducida por colágeno tratados con anticuerpo anti-activina A A1.

5 La Figura 3 proporciona datos que muestran que el tratamiento anti-activina A usando los anticuerpos A1, A2 y A3 previene la pérdida de peso corporal en ratones adultos jóvenes desnudos con un xenoinjerto intramuscular CHO/Activina.

La Figura 4 proporciona datos de RMN que muestran que el tratamiento anti-activina A previene la pérdida de masa magra corporal en ratones adultos jóvenes desnudos con un xenoinjerto intramuscular CHO/Activina.

La Figura 5 proporciona el efecto del anticuerpo anti-activina A A1 en los cambios en el peso corporal en ratones transducidos con AAV-activina A.

10 La Figura 6 proporciona la masa muscular del gastrocnemio en un modelo de caquexia de cáncer de Colon-26 en ratones CDF1 con y sin tratamiento con el anticuerpo anti-activina A A1, dieciocho días después de la inoculación del tumor.

La Figura 7 muestra un modelo de activina A, con la región de la unión del anticuerpo rodeada por un círculo. K21, K103 y X94 se refieren a los residuos de lisina en la posición 21 y 103, y un residuo de tirosina en la posición 94.

15 La Figura 8 es un gráfico que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3 según se determina usando KinExA. La constante de disociación en equilibrio se obtuvo a partir de la regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio con curva dual usando el software KinExA.

La Figura 9 muestra las regiones de epítipo que no estaban protegidas de degradación mediante la unión de los anticuerpos A1, A2 o A3.

20 La Figura 10 es un gráfico que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2, y A3 para activina A intacta (indicada por lote 55), así como activina A que está escindida en el residuo de tirosina en la posición de aminoácido número 94 (indicada por lote 38).

La Figura 11 es un gráfico que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2, y A3, así como dos anticuerpos disponibles comercialmente para la activina A o activina B en superficies con anticuerpo inmovilizado.

25 La Figura 12 muestra la unión de anticuerpo a quimeras activina A/activina B por el anticuerpo A1 y A2, así como dos anticuerpos disponibles comercialmente para la activina A.

La Figura 13 muestra las secuencias de aminoácidos de quimeras activina A/activina B utilizadas en el ensayo de anticuerpo descrito en la Figura 11.

30 La Figura 14 muestra la unión de varios anticuerpos, incluyendo A1, A2, y A3, a diferentes epítipos de la activina A; también se ensayaron dos anticuerpos disponibles comercialmente para la activina A.

Descripción detallada

35 La presente invención se refiere a regiones de la activina A humana que contienen dominios de nudo de cisteína reconocidas por anticuerpos que también se unen a activina A de longitud completa, y/o una región de activina A que se superpone o engloba una región de nudo de cisteína, y a métodos para preparar y usar estos dominios de nudo de cisteína. La invención también proporciona agentes de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente a activina A o partes de activina A. Los agentes de unión son útiles para bloquear o alterar la unión de activina A humana a uno o más ligandos.

40 La mortalidad por fallo cardíaco congestivo (CHF) está relacionada con caquexia. En un estudio (Anker, S. D. y Coats, A. J., Chest 115:836-847, 1999), el dieciséis por ciento de una población de pacientes ambulatorios CHF no seleccionada fue caquético. Este estado fue predictivo de pronóstico alterado independiente de la edad, clasificación funcional de la enfermedad, fracción de eyección ventricular izquierda, y pico de consumo de oxígeno. La mortalidad en el cohorte caquético fue cincuenta por ciento a los dieciocho meses.

45 Una ruta común en la progresión de la enfermedad en el cáncer, artritis reumatoide, fallo renal crónico, fallo cardíaco congestivo, y otras afecciones en las que la caquexia es un factor es la ruta de la activina A. El desgaste y la debilidad muscular son comunes en muchos estados patológicos y afecciones incluyendo envejecimiento, caquexia por cáncer, sepsis, desnervación, desuso, inactividad, quemaduras, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por VIH, fallo renal o cardíaco crónico, falta de carga/microgravedad, y distrofias musculares. Las activinas e inhibinas son miembros de la superfamilia de TGF-beta. Las activinas e inhibinas funcionan como estimuladores e inhibidores, respectivamente, de la secreción y biosíntesis de la hormona pituitaria estimulante del folículo (FSH). La activina A es la forma predominante de activina. En biología de la reproducción, las activinas e inhibinas son reguladores importantes del ciclo ovárico y del proceso de ovulación, y pueden jugar un papel en el implante del embrión, y/o mantenimiento del embarazo. (O'Connor et al., Human Reproduction, V. 14, No. 3, 827-832, marzo 1999; Draper et al., Endocrin., V. 138, No. 7: 3042-3046; Jones, et al., Endocrin. V. 147, No. 2: 724-732, feb. 2006).

La identificación de inhibinas y activinas en una amplia variedad de tejidos sugiere que estos factores juegan papeles mucho más importantes que el control de la secreción de FSH.

Las activinas interaccionan con dos clases estructuralmente relacionadas de receptores quinasa de serina/treonina (tipo I y tipo II). La inhibina antagoniza la activina mediante la unión al proteoglicano, betaglicano, y la formación de un complejo estable con y secuestrando de esta manera los receptores de activina tipo II mientras excluye a los receptores de tipo I. Existen dos formas principales de activina: la activina A es un homodímero de subunidades β_A y la activina B es un homodímero de subunidades β_B . (Vale, et al., Recent Prog Horm Res V. 44: 1-34, 1988). Los heterodímeros de una subunidad α que es diferente a las dos subunidades β resultan en el antagonista funcional inhibina.

La bibliografía ha mostrado que la activina A se sobreexpresa y/o localiza en tejidos cancerosos. Por ejemplo, se encontraron niveles altos de activina A sérica en mujeres con carcinoma endometrial y de cuello uterino (Petraglia, F. et al., Jour. Clin. Endocrin. Metab. 83:1194-1200, 1998). La activina A estaba sobreexpresada en cáncer colorrectal de estadio IV (Wildi, S. et al., Gut 49:409-417, 2001). Se indicó un papel de la activina A en el cáncer de ovario (Steller, M.D. et al., Mol. Cancer Res. 3:50-61, 2005).

La bibliografía también ha implicado a la activina A en la enfermedad renal. (Yamashita, S. et al. J. Am. Soc. Nephrol. 15:91-101, 2004.) Se indicaron niveles séricos de activina A inmunoreactiva en sujetos normales y pacientes con enfermedad por Harada, K. et al. en J. Clin. Endocrin. and Metab. 81:2125-2130, 1996. La activina A es un activador potente de los fibroblastos intersticiales renales (Harada, K. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 15:91-101, 2004). La sobreexpresión glomerular de activina A está ligada a fibrosis en glomerulonefritis anti-Thy 1 (Gaedeke, J. et al., Neph. Dial. Transpl. 20:319-328, 2005).

Los niveles séricos de activina A en los pacientes con fallo cardíaco se incrementan según la gravedad de la enfermedad (Yndestad et al., Circulation 109:1379-1385, 2004). En un modelo de rata de fallo cardíaco, la activina A sérica se elevó inmediatamente después del infarto de miocardio y persistió durante seis meses, y la inmunotinción de la activina A se localizó sólo en los cardiomiocitos (Yndestad et al., 2004). Se indicaron niveles elevados de activina A en fallo cardíaco (Yndestad, A. et al., Circulation 109:1379-1385, 2004).

La presente descripción proporciona composiciones, kits, y métodos relacionados con moléculas que se unen a la activina A, incluyendo moléculas que agonizan o antagonizan la activina A, tales como anticuerpos anti-activina A, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos anti-activina A antagonistas, fragmentos de anticuerpo, o derivados de anticuerpo. También se proporcionan composiciones, kits, y métodos relacionados con moléculas que se unen específicamente a una parte de la activina A, tales como aminoácidos R13-Y39, o aminoácidos V82-N107 de la activina A. Dichas moléculas pueden incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo. También se proporcionan ácidos nucleicos, y derivados y fragmentos de éstos, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica todo o una parte de un polipéptido que se une a la activina A, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica todo o parte de un anticuerpo anti-activina A, fragmento de anticuerpo, variante de anticuerpo, o derivado de anticuerpo, plásmidos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células o líneas celulares que comprenden dichos ácidos nucleicos y/o vectores y plásmidos. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos para preparar, identificar, o aislar moléculas que se unen a la activina A, tales como anticuerpos anti-activina A, métodos para determinar si una molécula se une a la activina A, métodos para preparar las composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden una molécula que se une a la activina A, y métodos para administrar una molécula que se une a la activina A a un sujeto, por ejemplo, métodos para tratar una afección mediada por la activina A, y para modular una actividad biológica de la activina A *in vivo* o *in vitro*.

Las secuencias de polinucleótido y polipéptido se indican usando abreviaturas estándar de una o tres letras. A no ser que se indique otra cosa, las secuencias de polipéptido tienen su extremo amino a la izquierda y su extremo carboxi a la derecha, y secuencias de ácido nucleico monocatenarias, y la cadena superior de las secuencias de ácido nucleico bicatenarias, tienen sus extremos 5' a la izquierda y sus extremos 3' a la derecha. Una secuencia particular de polipéptido o polinucleótido también puede describirse explicando cómo se diferencia de una secuencia de referencia. A no ser que se indique otra cosa, se entiende que las secuencias de polinucleótido y polipéptido incluyen cada ácido nucleico o aminoácido listado, respectivamente, así como los ácidos nucleicos o aminoácidos que intervienen. Por ejemplo, la secuencia de polipéptido R13-Y39 muestra una secuencia de polipéptido que incluye los aminoácidos R13, y Y39, así como los aminoácidos que se encuentran entre R13 y Y39 en la secuencia de polipéptido. Correspondientemente, la secuencia de polinucleótido C1-T5 muestra una secuencia de polinucleótido que incluye los ácidos nucleicos C1, y T5, así como los ácidos nucleicos en las posiciones 2, 3, y 4 de la secuencia. De acuerdo con esto, las designaciones de SEQ ID NO: 1-5 designan asimismo el grupo inclusivo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5. Finalmente, también se pretende que las agrupaciones de aminoácidos sean inclusivas, a no ser que se designe otra cosa. Por ejemplo, la expresión "aminoácidos 1-5 de SEQ ID NO: 28" incluye los aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, y 5 de SEQ ID NO: 28.

Las secuencias de polinucleótido y polipéptido de dominios variables de cadena ligera y pesada particulares se muestran más adelante. Los anticuerpos que comprenden una cadena ligera y cadena pesada se designan combinando el nombre de los dominios variables de la cadena ligera y del de los de la cadena pesada. Por ejemplo,

"L4H7," indica un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena ligera de L4 y el dominio variable de cadena pesada de H7.

Las secuencias constantes de cadena ligera kappa se muestran en SEQ ID NO:84, 100 y 108, y las secuencias constantes de cadena pesada se muestran en SEQ ID NO:214, 215 y 221. Los polinucleótidos que codifican estas secuencias se muestran, para las cadenas ligeras, respectivamente, en SEQ ID NO:222, 223 y 239, y para las cadenas pesadas, respectivamente, en SEQ ID NO:240, 241, y 242. Así, además de las secuencias variables como se describe en la presente memoria, un anticuerpo puede comprender una o ambas de SEQ ID NO:84 y 214; o SEQ ID NO:215 y 223; o SEQ ID NO:108 y 221.

Un anticuerpo puede comprender una cadena pesada o ligera específica, mientras el dominio variable de cadena ligera o pesada complementario no se especifica. En particular, determinadas realizaciones en la presente memoria incluyen anticuerpos que se unen a un antígeno específico (tal como activina A) mediante una cadena ligera o pesada específica, de manera que la cadena pesada o ligera complementaria puede ser promiscua, o incluso irrelevante, pero puede determinarse, por ejemplo, cribando bibliotecas combinatorias. Portolano et al., J. Immunol. V. 150 (3), p. 880-887 (1993); Clackson et al., Nature v. 352 p. 624-628 (1991).

A no ser que se defina otra cosa en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en la presente memoria son muy conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan a cabo generalmente según métodos convencionales muy conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación a no ser que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante, como se consigue comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. La terminología usada en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente memoria son los muy conocidos y usados comúnmente en la técnica. Pueden usarse técnicas estándar para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de pacientes.

Debe entenderse que los términos siguientes, a no ser que se indique otra cosa, tienen los significados siguientes:

El término "molécula aislada" (en el que la molécula, es por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido, o un anticuerpo) es una molécula que gracias a su origen o fuente de obtención (1) no está asociada con componentes con los que está naturalmente asociada que la acompañan en su estado nativo, (2) carece sustancialmente de otras moléculas de la misma especie (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no aparece en la naturaleza. Así, una molécula que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, estará "aislada" de los componentes con los que está asociada naturalmente. También puede conseguirse que una molécula carezca sustancialmente de componentes con los que está asociada naturalmente por aislamiento, usando técnicas de purificación muy conocidas en la técnica. La pureza u homogeneidad de la molécula puede ensayarse mediante varios medios muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptido puede ensayarse usando electroforesis en gel de poliácridamida y tiñendo el gel para visualizar el polipéptido usando técnicas muy conocidas en la técnica. Para determinados propósitos, puede proporcionarse una resolución mayor usando HPLC u otros medios muy conocidos en la técnica para la purificación.

Los términos "inhibidor de activina A" y "antagonista de activina A" se usan indistintamente. Cada uno es una molécula que inhibe de forma detectable al menos una función de la activina A. A la inversa, un "agonista de activina A" es una molécula que incrementa de forma detectable al menos una función de la activina A. La inhibición causada por un inhibidor de la activina A no necesita ser completa siempre que sea detectable usando un ensayo. Puede usarse cualquier ensayo de una función de la activina A, ejemplos de los cuales se proporcionan en la presente memoria. Los ejemplos de funciones de la activina A que pueden inhibirse por un inhibidor de la activina A, o incrementarse por un agonista de la activina A, incluyen unión a activina A. Los ejemplos de tipos de inhibidores de activina A y agonistas de activina A incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos de unión a activina A tales como proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, proteínas de unión a antígeno que inhiben la activina A), anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo.

Los términos "péptido," "polipéptido" y "proteína" se refieren cada uno a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Estos términos engloban, por ejemplo, proteínas nativas y artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido (tales como muteínas, variantes, y proteínas de fusión) de una secuencia de proteína así como proteínas modificadas después de la traducción, o modificadas de

otra forma covalentemente o no covalentemente. Un péptido, polipéptido, o proteína puede ser monomérico o polimérico.

El término "fragmento de polipéptido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino terminal y/o carboxi terminal comparado con una proteína correspondiente de longitud completa. Los fragmentos pueden tener, por ejemplo, una longitud de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos. Los fragmentos también pueden tener, por ejemplo, una longitud de como máximo 1.000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11, ó 10 aminoácidos. Un fragmento puede comprender además, en uno o ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente natural (por ejemplo, un dominio Fc o de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia conectora artificial).

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que se han modificado de cualquier forma por cualquier razón, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos de proteína, (4) alterar las afinidades de unión, y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Los análogos incluyen muteínas de un polipéptido. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia natural (por ejemplo, en la parte del polipéptido que está fuera del o de los dominios que forman contactos intermoleculares). Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan a la secuencia parental o que son necesarias para su funcionalidad). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se insertan en, se delecionan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia del polipéptido nativo, y retiene esencialmente la misma actividad biológica que el polipéptido nativo. La actividad biológica del polipéptido puede medirse usando técnicas estándar en la técnica (por ejemplo, si la variante es un anticuerpo, su actividad puede ensayarse mediante ensayos de unión, como se describe en la presente memoria). Las variantes de la invención incluyen fragmentos, análogos, polipéptidos recombinantes, polipéptidos sintéticos, y/o proteínas de fusión. Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se ha modificado químicamente, por ejemplo mediante conjugación con otro resto químico tal como, por ejemplo, polietilen glicol, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), fosforilación, y glicosilación. A no ser que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos, y muteínas de éstos, ejemplos de los cuales se describen más adelante.

Una "proteína de unión a antígeno" es una proteína que comprende una parte que se une a un antígeno y, opcionalmente, una parte de soporte o marco que permite a la parte de unión a antígeno adoptar una conformación que estimula la unión de la proteína de unión a antígeno al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, una parte de unión a antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpo, y análogos de anticuerpo. La proteína de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, un soporte de proteína alternativo o soporte artificial con CDR o derivados de CDR injertados. Dichos soportes incluyen, pero no están limitados a, soportes derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas, por ejemplo, para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión a antígeno así como soportes completamente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véase, por ejemplo, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volumen 53, Ejemplar 1:121-129; Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654. Además, pueden usarse miméticos peptídicos de anticuerpo ("PAM"), así como soportes basados en miméticos de anticuerpo que utilizan componentes de fibronectina como un soporte.

Una proteína de unión a antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina natural. Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina natural, cada tetrámero está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas de polipéptido, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alpha, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. En las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, generalmente, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada pareja cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de manera que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión.

Las cadenas de inmunoglobulina naturales presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publicación no. 91-3242, 1991.

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una parte de unión a antígeno de ésta que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica, a no ser que se especifique otra cosa. Las partes de unión a antígeno pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno incluyen, entre otras, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio (dAb), y fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena única (scFv), anticuerpos quiméricos, fragmentos divalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes, y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica a antígeno al polipéptido.

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que tiene los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd tiene los dominios V_H y C_H1; un fragmento Fv tiene los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb tiene un dominio V_H, un dominio V_L, o un fragmento de unión a antígeno de un dominio V_H o V_L (Pat. US No. 6.846.634, 6.696.245, Pub. Solic. US No. 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989).

Un anticuerpo de cadena única (scFv) es un anticuerpo en el que una región V_L y una V_H están unidas a través de un conector (por ejemplo, una secuencia sintética de residuos de aminoácidos) para formar una cadena de proteína continua en la que el conector es lo suficientemente largo para permitir que la cadena de proteína se pliegue sobre sí misma y formar un sitio de unión a antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988, *Science* 242:423-26 y Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Los fragmentos bivalentes son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas de polipéptido, en el que cada cadena de polipéptido comprende dominios V_H y V_L unidos por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, permitiendo así que cada dominio se empareje con un dominio complementario en otra cadena de polipéptido (véase, por ejemplo, Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, y Poljak et al., 1994, *Structure* 2:1121-23). Si dos cadenas de polipéptido de un fragmento bivalente son idénticas, entonces el fragmento bivalente que resulta de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión a antígeno idénticos. Las cadenas de polipéptido que tienen diferentes secuencias pueden usarse para preparar un fragmento divalente con dos sitios de unión a antígeno diferentes. De manera similar, los fragmentos trivalentes y fragmentos tetravalentes son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas de polipéptido, respectivamente, y forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de un anticuerpo dado pueden identificarse usando el sistema descrito por Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publicación no. 91-3242, 1991. Una o más CDR pueden incorporarse en una molécula bien covalentemente o no covalentemente para hacer que sea una proteína de unión a antígeno. Una proteína de unión a antígeno puede incorporar la(s) CDR como parte de una cadena de polipéptido mayor, puede unir covalentemente la(s) CDR a otra cadena de polipéptido, o puede incorporar la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDR permiten que la proteína de unión a antígeno se una específicamente a un antígeno particular de interés.

Una proteína de unión a antígeno puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana natural típicamente tiene dos sitios de unión idénticos, mientras un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

El término "anticuerpo humano," también referido como "anticuerpo completamente humano," incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humanas. En una realización, todos los dominios variables y constantes se obtienen de secuencias de inmunoglobulina humanas (un anticuerpo completamente humano). Estos anticuerpos pueden prepararse de varias formas, ejemplos de las cuales se describen más adelante, incluyendo mediante la inmunización con un antígeno de interés un ratón que está genéticamente modificado para expresar los anticuerpos derivados de genes que codifican cadenas pesadas y/o ligeras humanas.

Un anticuerpo humanizado tiene una secuencia que se diferencia de la secuencia de un anticuerpo derivado de una especie no humana en una o más sustituciones, delecciones, y/o adiciones de aminoácidos, de manera que es menos probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmune, y/o induce una respuesta inmune menos grave, comparado con el anticuerpo de especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, determinados aminoácidos en los dominios marco y constantes de las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo de especie no humana se mutan para producir el anticuerpo humanizado. En otra realización, el o los

dominios constantes de un anticuerpo humano se fusionan con el o los dominios variables de una especie no humana. En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos en una o más secuencias CDR de un anticuerpo no humano se cambian para reducir la inmunogenicidad probable del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en el que los residuos de aminoácidos cambiados bien no son críticos para la unión inmuno-específica del anticuerpo a su antígeno, o los cambios que se hacen en la secuencia de aminoácidos son cambios conservativos, de manera que la unión del anticuerpo humanizado al antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano al antígeno. Los ejemplos de cómo preparar anticuerpos humanizados pueden encontrarse en las Pat. U.S. Nos. 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes. En una realización, una o más CDR se obtienen de un anticuerpo anti-activina A humano. En otra realización, todas las CDR se obtienen de un anticuerpo anti-activina A humano. En otra realización, las CDR de más de un anticuerpo anti-activina A humano se mezclan y emparejan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-activina A humano, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-activina A humano, y las CDR de la cadena pesada de un tercer anticuerpo anti-activina A. Además, las regiones marco pueden obtenerse de uno de los mismos anticuerpos anti-activina A, de uno o más anticuerpos diferentes, tales como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado. En un ejemplo de un anticuerpo quimérico, una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, homóloga a, o derivada de un anticuerpo de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a, homólogo a, o derivado de un(os) anticuerpo(s) de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada (es decir, la capacidad de unirse específicamente a activina A).

Los fragmentos o análogos de anticuerpos pueden prepararse fácilmente por los expertos en la técnica según las enseñanzas de esta especificación y usando técnicas muy conocidas en la técnica. Los extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos aparecen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación con los datos de secuencia de nucleótido y/o aminoácido de bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Pueden usarse métodos de comparación informatizados para identificar restos de secuencia o dominios de conformación de proteína predichos que aparecen en otras proteínas con estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteína que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, por ejemplo, Bowie et al., 1991, Science 253:164.

Además, los anticuerpos específicos de antígeno (es decir, específicos de activina A) pueden producirse por métodos conocidos en la técnica usando un dominio VL o VH específico para cribar una biblioteca del dominio variable complementario. Dichos métodos para producir anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de anticuerpo fusionados con otra proteína, tal como una proteína de cubierta menor, para enriquecer fagos con antígeno. Después, usando una biblioteca combinatoria aleatoria de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) reorganizadas de ratones inmunes al antígeno (por ejemplo, activina A), se presentan diversas bibliotecas de fragmentos de anticuerpo en la superficie del fago. Estas bibliotecas pueden cribarse para dominios variables complementarios, y los dominios pueden purificarse, por ejemplo, por columna de afinidad. Véase, Clackson et al., Nature, V. 352 p. 624-628 (1991).

En otro ejemplo, pueden usarse cadenas VL o VH individuales de un anticuerpo (es decir, anticuerpo para activina A) para buscar otras cadenas VH o VL que podrían formar fragmentos de unión a antígeno (o Fab), con la misma especificidad. Así, pueden expresarse combinaciones aleatorias de genes de Ig de cadenas VH y VL como fragmentos de unión a antígeno en una biblioteca de bacteriófagos (tal como fago fd o lambda). Por ejemplo, puede generarse una biblioteca combinatoria utilizando la biblioteca de cadena VL o VH parental combinada con bibliotecas de cadena VL o VH de unión específica a antígeno, respectivamente. Las bibliotecas combinatorias pueden cribarse por técnicas convencionales, por ejemplo, usando una sonda marcada radiactivamente (tal como activina A marcada radiactivamente). Véase, por ejemplo, Portolano et al., J. Immunol. V. 150 (3) p. 880-887 (1993).

Un "anticuerpo injertado con CDR" es un anticuerpo que comprende una o más CDR derivadas de un anticuerpo de una especie o isotipo particular y el marco de otro anticuerpo de la misma especie o isotipo o diferente.

Un "anticuerpo multi-específico" es un anticuerpo que reconoce más de un epítipo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo bi-específico" que reconoce dos epítopos distintos en el mismo o en diferentes antígenos.

Un "dominio de unión a antígeno," "región de unión a antígeno," o "sitio de unión a antígeno" es una parte de una proteína de unión a antígeno que contiene residuos de aminoácidos (u otros restos) que interaccionan con un antígeno y contribuyen a la especificidad y afinidad de la proteína de unión a antígeno para el antígeno. Para un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno, esto incluirá al menos parte de al menos uno de sus dominios CDR.

Un "epítipo" es la parte de una molécula a la que se une una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). Un epítipo puede comprender partes no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido,

residuos de aminoácidos que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están lo suficientemente cerca entre sí como para unirse a una proteína de unión a antígeno), e incluye los aminoácidos finales de la secuencia listados. Por ejemplo, la secuencia de polipéptido R13-Y39 incluye los aminoácidos R13, y Y39, así como los aminoácidos encontrados entre R13 y Y39 en la secuencia. En realizaciones en las que el epítipo comprende partes no contiguas de una molécula, las secuencias se indicarán de acuerdo con esto

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de polinucleótido o dos secuencias de polipéptido se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP (una parte del GCG Wisconsin Package, versión 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) usando sus parámetros por defecto.

Los términos "polinucleótido," "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en este documento e incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de nucleótidos no naturales), e híbridos de éstos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco de lectura abierto contiguo que codifica un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína, o variante de éste, de la invención.

Dos polinucleótidos monocatenarios son "el complemento" uno de otro si sus secuencia pueden alinearse en una orientación anti-paralela de manera que cada nucleótido en un polinucleótido es opuesto a su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos no emparejados en el extremo 5' o el 3' de las secuencias. Un polinucleótido es "complementario" a otro polinucleótido si los dos polinucleótidos pueden hibridar entre sí en condiciones moderadamente astringentes. Así, un polinucleótido puede ser complementario a otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que puede usarse para introducir otro ácido nucleico unido a él en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido," que se refiere a una molécula de ADN bicatenaria lineal o circular en la que pueden ligarse segmentos adicionales de ácido nucleico. Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), en los que pueden introducirse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprende un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma huésped. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

Una secuencia de nucleótidos está "unida de manera operativa" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora influye en la expresión (por ejemplo, el nivel, momento, o localización de la expresión) de la secuencia de nucleótidos. Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que influye en la expresión (por ejemplo, el nivel, momento, o localización de la expresión) de un ácido nucleico al que está unido de manera operativa. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o a través de la acción de una o más moléculas diferentes (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o el ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Los ejemplos adicionales de secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA y Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

Una "célula huésped" es una célula que puede usarse para expresar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula huésped puede ser un procariota, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucariota, por ejemplo, una eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula de planta (por ejemplo, una célula de planta de tabaco o tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón, o una célula de insecto) o un hibridoma. El Ejemplo 3 de la presente memoria describe el uso de células CS-9. Los ejemplos de otras células huésped incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como CHO VEGGIE y líneas celulares relacionadas que crecen en medio sin suero (véase Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (véase McMahon et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821), células de riñón embrionario humano tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células epidérmicas humanas A431, células humanas Colo205, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Típicamente, una célula huésped es una célula cultivada que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que puede expresarse en la célula huésped. La expresión "célula huésped recombinante" puede usarse para indicar una célula huésped que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico que se va a expresar. Una célula huésped también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero no lo expresa a un nivel deseado a no ser que se introduzca una secuencia reguladora en la célula huésped de manera que se encuentra unida de manera operativa con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula huésped se refiere no sólo a la

célula objeto particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Como pueden aparecer determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido, por ejemplo, a mutación o influencia del entorno, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún así está incluida en el alcance del término tal y como se usa en la presente memoria.

5 Proteínas de unión a antígeno

En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo, muteínas de anticuerpo, y variantes de anticuerpo), que se unen a activina A, por ejemplo, activina A humana, según la reivindicación 1.

10 Las proteínas de unión a antígeno según la presente invención incluyen proteínas de unión a antígeno que inhiben una actividad biológica de activina A. Por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno pueden atenuar la caquexia, y esta actividad puede estar presente cuando la proteína de unión a antígeno es completamente humana, tal como un anticuerpo completamente humano.

15 Diferentes proteínas de unión a antígeno pueden unirse a diferentes dominios o dominios de nudo de cisteína de activina A o actuar por diferentes mecanismos de acción. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o más dominios de nudo de cisteína particulares, o regiones interpuestas entre enlaces disulfuro, incluyendo regiones que abarcan de aproximadamente los aminoácidos 4-12, aminoácidos 11-81, aminoácidos 11-33, aminoácidos 13-39, aminoácidos 40-113, aminoácidos 44-115, aminoácidos 81-111, y/o aminoácidos 82-107 de SEQ ID NO:1. Como se indica en la presente memoria, entre otros, la región de dominio se designan de manera que son inclusivas del grupo, a no ser que se indique otra cosa. Por ejemplo, los aminoácidos 4-12 se refiere a nueve aminoácidos: aminoácidos en las posiciones 4, y 12, así como los siete aminoácidos que intervienen en la secuencia. Otros ejemplos incluyen proteínas de unión a antígeno que inhiben la unión de la activina A a su receptor. Una proteína de unión a antígeno no necesita inhibir completamente una actividad inducida por la activina A para encontrar uso en la presente invención; en lugar de esto, las proteínas de unión a antígeno que reducen una actividad particular de la activina A también están contempladas para usarse. 25 (Las discusiones en la presente memoria de mecanismos particulares de acción para las proteínas de unión a antígeno que se unen a la activina A para tratar enfermedades particulares son sólo ilustrativas, y los métodos presentados en la presente memoria no están forzados de esta manera.)

En otro aspecto, la presente descripción proporciona proteínas de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en A1-A14 o una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en A1-A14, y fragmentos, derivados, muteínas, y variantes de éstas. Dicha proteína de unión a antígeno puede indicarse usando la nomenclatura "LxHy", en la que "x" corresponde al número de la región variable de cadena ligera e "y" corresponde al número de la región variable de cadena pesada como están marcados en las secuencias siguientes. Es decir, por ejemplo, que "A1HC" indica la región variable de cadena pesada del anticuerpo A1; "A1LC" indica la región variable de cadena ligera del anticuerpo A1, y así sucesivamente. 35 Hablando más generalmente, "L2H1" se refiere a una proteína de unión a antígeno con una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de L2 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de H1. Para claridad, todos los intervalos indicados por al menos dos miembros de un grupo incluyen todos los miembros del grupo entre e incluyendo los miembros de los extremos del intervalo. Así, el intervalo de grupo A1-A14, incluye todos los miembros entre A1 y A14, así como los miembros A1 y A14 en sí mismos. El intervalo de grupo A4-A6 incluye los miembros A4, A5, y A6, etc. 40

También se muestran más adelante las localizaciones de las CDR, o Regiones Determinantes de la Complementariedad (sombreado y subrayado) que crean parte del sitio de unión a antígeno, mientras las Regiones Marco (FR) son los segmentos que intervienen de estas secuencias de dominio variable. Tanto en las regiones variables de cadena ligera como las regiones variables de cadena pesada hay tres CDR (CDR 1-3) y cuatro FR (FR 1-4). Las regiones CDR de cada cadena ligera y pesada también se agrupan por tipo de anticuerpo (A1, A2, A3, etc.). Las proteínas de unión a antígeno según se describe incluyen, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno que tienen una combinación de dominios variables de cadena ligera y cadena pesada seleccionados del grupo de combinaciones que consiste en L1H1 (anticuerpo A1), L2H2 (anticuerpo A2), L3H3 (anticuerpo A3), L4H4 (anticuerpo A4), L5H5 (anticuerpo A5), L6H6 (anticuerpo A6), L7H7 (anticuerpo A7), L8H8 (anticuerpo A8), L9H9 (anticuerpo A9), L10H10 (anticuerpo A10), L11H11 (anticuerpo A11), L12H12 (anticuerpo A12), L13H13 (anticuerpo A13), y L14H14 (anticuerpo A14). 45 50

Polinucleótidos de región variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos A1-A14 (también referidos en la presente memoria como H1-H14 y L1-L14).

A1 HC

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGTTATGGTCTCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCATCCCTTACA
ATGGTAACACAACTCTGCACAGAACTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGACAGGGACTACGGTGTCAATTATGATGCTTT
TGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:2)

A1 LC

5 TCCTATGAGGTGACTCAGGCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGTTGGTATCAGCA
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAGCAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGAAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACA
GCAGCACTGCGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:1)

A2 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGTCGGAAGTGGAACTACGACAACTACTACTA
CGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID
NO:18)

A2 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATAATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT
CACAATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTACAACCTTATTACTGTCTACAGCAT
AATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID
NO:17)

10 A3 HC

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGCCTGGCCAAACATAAAGCAAGATG
GAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAATTCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAGCAGCAGCTGGTACTACTACAACTACGG
TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:34)

A3 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTGCGACAGCAA
AATACTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID
NO:33)

A4HC

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATCCACTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACA
GTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGG
ACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGATTTCGGGGTATAGCAGCAGCTGGCACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:50)

A4 LC

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGATACAATA
TTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTG
GGTTCTTTTCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAGGCA
CAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA
CTGCATGCAAGCTCTCCAACTCCGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG (SEQ ID NO:49)

5 A5 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGG
GAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACAC
GTCCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATAGCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCT
GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCATGCGCCCT (SEQ
ID NO:66)

A5 LC

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGG
CCACCATCACCTGCAAGTCCAGCCAGAGTATTTTATACAGTTCCAACAATAAGAA
GTATCTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGATCATTTAC
TGGACATCTATGCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA
TTACTGTGAGCAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAA (SEQ ID NO:65)

10 A6 HC

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGCTTACTACTGGAGCTGGAT
CCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGG
AGGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACAC
GTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGTACAGTGGCTCGAACTGGCCTACTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:82)

A6LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCA
GCAGAGACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTACATCCAGTTTGCAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTAAAGTTACTACTGTCAACAGAGTTA
CAGTATTTTCGCCCACTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGAACAAA (SEQ ID
NO:81)

A7 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTGGTATGATG
GAAGTACTGAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGCGAGTGGCTCTACCACTACGGTATGG
ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:98)

5 A7 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAGGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGTCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAACAT
AATACTTACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATATCAAA (SEQ ID
NO:97)

A8 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGG
GAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGGCGAGTCACCATATCAGTAGACAC

GTCCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATAGCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:114)

10 A8 LC

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGG
CCACCATCACCTGCAAGTCCAGCCAGAGTATTTTATACAGCTCCAACAATAAGAA
GTATCTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGTTGATCATTTAC
TGGACATCTATGCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTA
TTACTGTGAGCAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAA (SEQ ID NO:113)

A9 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGTCGGAAGTGGAACTACGACAATACTACTA
CGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
NO:130)

A9 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGGCATTAGAAATAATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTACAACCTTATTACTGTCTACAGCAT
AATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID
NO:129)

A10 HC

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTG
AAGATCTCCTGTCAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGG
TGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTG
ACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGA
CAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATT
ACTGTGCGAGACAAGGACTGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:146)

5 A10 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGAAAAATGGGGAGAGAAATATGCTTGTTGGTATCAGC

AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATACCAAGCGGCCCTC
CGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCATTTCTGGGAACACAGCCACTCTGACC
ATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTATTGTCAGGCGTGGGAC
AGGAGCACTGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:145)

A11 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCTT
ACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGT
TGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGCGCTTACGGTGACTATCGCGGCTGGTTCGACC
CCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:162)

10 A11 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATTGGGGGATAAAATTTGCTTTCTGGTATCAGCT
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAACAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGCGGCTGACTTTTACTGTCAGGCGTGGGACA
GCAGCACTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID
NO:161)

A12 HL

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGCCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGTCGGAACCTGGAACCTACGACTCCTACCAATA
CGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
NO:178)

A12 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTGTGCAACTTATTATTGTCTACAGCAT
AATAGTTATACGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID
NO:177)

A13 HC

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGAGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA
ATGGTAACACAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACACATCAACGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGG
CCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:194)

5

A13 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATTGGGGGATAAAATATGTTTGTGTTGGTATCAGCA
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGAACTGGTCATCTATCTAGATAACAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGAGGCGTGGGACA
GCAGCACGGTATTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCGTCCTG (SEQ ID NO:193)

A14 HC

CAGGTTTCAGCTGGTGCATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCCCTTACA
ATGGTAACACAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGCGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGA
CCCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO:210)

10 A14 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCT
CCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATTGGGGGATAAAATATGCTTTCTGGTATCAGCA
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCTTCTATCATGATACCAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATCACTGTGAGGCGTGGGACA
GCAGCACGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAC (SEQ ID NO:209)

Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos A1-A14, regiones variables de cadena ligera. Las regiones CDR están sombreadas y subrayadas; los segmentos o regiones que intervienen se refieren como marco (FR) en la presente memoria.

A1

SYEVTQAPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:9)

15

A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFTTYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:25)

A3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCROQNTYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:41)

A4

DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSTGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR
ASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPCSFGQGTKLEIK (SEQ
ID NO:57)

A5

DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLVWYQQKPGQPPKLIYWTS
MRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:73)

A6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISNYLNWYQQRPGKAPKLLIYATSSLQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFVSYYCQQSYSISPTFGGGTKVENK (SEQ ID
NO:89)

5

A7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRAGQGIRNDLVWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID
NO:105)

A8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLVWYQQKPGQPPKLIYWTS
MRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:121)

A9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFTTYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:137)

A10

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEKWGEKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDTRPSGIP
ERFSGSISGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:153)

A11

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQLKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDAADFYCQAWDSSTVFVGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:169)

10

A12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDCATYYCLQHNSYTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:185)

A13

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVFVGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:201)

A14

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAFWYQQKPGQSPVLVIFYHDTKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHCQAWDSSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:217)

Anticuerpos A1-A14, secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada. Las regiones CDR están sombreadas y subrayadas, las demás regiones se refieren como marco (FR) en la presente memoria.

A1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIIPYN
GNTNSAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDRDYGVNYDAFDI
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:10)

A2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDG
SNKYHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNYDNYYYG
LDVWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:26)

A3

EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLECVANIKODGS
EEYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSSWYYNYGMD
YWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:42)

A4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCARDSGYSSSWHFDY
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:58)

A5

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDIAAPFDYWGQGTMTVTV
SS (SEQ ID NO:74)

A6

QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGG
TNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVQWLELAYFDYWGQG
TLTVTVSS (SEQ ID NO:90)

A7

QVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDG
STEYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERQWLYHYGMDV
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:106)

A8

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKRRVTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDIAAPFDYWGQGTMTVTV
SS (SEQ ID NO:122)

A9

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDG
SNKYHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNYDNYYYG
LDVWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:138)

A10

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSFYTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPGDS
DTRYSPSFQGVQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQGLGFDYWGQGTMTV
TVSS (SEQ ID NO:154)

A11

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYISYSGS
TYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAYGDYRGWFDPWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO:170)

A12

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSAYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD
GSNKYYADSVKGRFIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSRNWNYDSYQY
 GLDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:186)

A13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLERMGWISAYN
GNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYYDSSGWG
 HWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:202)

A14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPYN
GNTNYAQKFQGRVTMTTDTKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYYDSSGWD
 WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:218)

5 Secuencias CDR consenso para los Anticuerpos A1-A14.

Cadena Ligera	Secuencia CDR1
L4	R S S Q S L L H S T G Y N - Y L D
<u>L5, L8</u>	<u>K S S Q S I L Y S S N N K K Y L V</u> (SEQ ID NO:75)
CONSENSO:	X ₁ S S Q S X ₂ L X ₃ S X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ Y L X ₉ (SEQ ID NO:115)
X ₁ es un residuo de arginina o un residuo de lisina, X ₂ es un residuo de leucina o un residuo de isoleucina, X ₃ es un residuo de histidina o un residuo de tirosina, X ₄ es un residuo de treonina o un residuo de serina, X ₅ es un residuo de glicina o un residuo de asparagina, X ₆ es un residuo de tirosina o un residuo de asparagina, X ₇ es un residuo de asparagina o un residuo de lisina, X ₈ es un residuo de lisina o ningún residuo, X ₉ es un residuo de aspartato o un residuo de valina	
L2, L9	R A S Q G I R N N L G (SEQ ID NO:27)
L3, L12	R A S Q G I R N D L G (SEQ ID NO:43)
L6	R A S Q S I S N Y L N (SEQ ID NO:91)
<u>L7</u>	<u>R A G Q G I R N D L V</u> (SEQ ID NO:107)
CONSENSO:	R A X ₁₀ Q X ₁₁ I X ₁₂ N X ₁₃ L X ₁₄ (SEQ ID NO:116)
X ₁₀ es un residuo de serina o un residuo de glicina, X ₁₁ es un residuo de serina o un residuo de glicina,	

ES 2 528 798 T3

X₁₂ es un residuo de serina o un residuo de arginina, X₁₃ es un residuo de tirosina, un residuo de aspartato, o un residuo de asparagina X₁₄ es un residuo de aspartato, un residuo de valina, o un residuo de glicina	
L1	S G D K L G D K Y A C (SEQ ID NO:11)
L10	S G E K W G E K Y A C (SEQ ID NO:155)
L11	S G D K L G D K F A F (SEQ ID NO:171)
L13	S G D K L G D K Y V C (SEQ ID NO:203)
<u>L14</u>	<u>S G D K L G D K Y A F (SEQ ID NO:219)</u>
CONSENSO:	S G X ₁₅ KX ₁₆ G X ₁₇ KX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ (SEQ ID NO:123)
X₁₅ es un residuo de glutamato o un residuo de aspartato, X₁₆ es un residuo de triptófano o un residuo de leucina, X₁₇ es un residuo de glutamato o un residuo de aspartato, X₁₈ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina, X₁₉ es un residuo de alanina o un residuo de valina, X₂₀ es un residuo de cisteína o un residuo de fenilalanina	
Cadena Ligera	Secuencia CDR2
L2	A T S S L Q S (SEQ ID NO:92)
L3, L6, L7, L9, L12	A A S S L Q S (SEQ ID NO:44)
L5, L8	W T S M R E S (SEQ ID NO:76)
<u>L4</u>	<u>L G S F R A S</u>
CONSENSO:	X ₄₀ X ₄₁ SX ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ S (SEQ ID NO:124)
X₄₀ es un residuo de alanina, un residuo de triptófano, o un residuo de leucina, X₄₁ es un residuo de treonina, un residuo de alanina, o un residuo de glicina, X₄₂ es un residuo de serina, un residuo de metionina, o un residuo de fenilalanina, X₄₃ es un residuo de leucina o un residuo de arginina, X₄₄ es un residuo de glutamina, un residuo de un residuo de glutamato, o un residuo de alanina	
L10	Q D T K R P S (SEQ ID NO:156)
L11	Q D N K R P S (SEQ ID NO:172)
L1	Q D S K R P S (SEQ ID NO:12)
L13	L D N K R P S (SEQ ID NO:204)

<u>L14</u>	<u>H D T K R P S</u> (SEQ ID NO:220)
CONSENSO:	X ₄₅ D X ₄₆ K R P S (SEQ ID NO:128)
X ₄₅ es un residuo de glutamina, un residuo de leucina, o un residuo de histidina, X ₄₆ es un residuo de treonina, un residuo de asparagina, o un residuo de serina	
Cadena Ligera	Secuencia CDR3
L1	Q A W D S S T A V (SEQ ID NO:13)
L10	Q A W D R S T - V (SEQ ID NO:157)
L11	Q A W D S S T V V (SEQ ID NO:173)
<u>L13, L14</u>	<u>Q A W D S S T V</u> - (SEQ ID NO:205)
L2	L Q H N S Y P W T (SEQ ID NO:29)
L7	L Q H N T Y P F T (SEQ ID NO:109)
L9	L Q H N S Y P W T (SEQ ID NO:141)
<u>L12</u>	<u>L Q H N S Y T W T</u> (SEQ ID NO:189)
CONSENSO:	L Q H N X ₈₉ Y X ₈₂ X ₈₃ T (SEQ ID NO:131)
X ₈₁ es un residuo de treonina o un residuo de serina, X ₈₂ es un residuo de prolina o un residuo de treonina, X ₈₃ es un residuo de fenilalanina o un residuo de triptófano	
L3	R Q Q N T Y P L T (SEQ ID NO:45)
L4	M Q A L Q T P C S
L5	Q Q Y Y S T P W T (SEQ ID NO:77)
L6	Q Q S Y S I S P T (SEQ ID NO:93)
<u>L8</u>	<u>Q Q Y Y S T P W T</u> (SEQ ID NO:125)
CONSENSO:	X ₇₃₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ X ₈₀ (SEQ ID NO:132)
X ₇₃ es un residuo de metionina, un residuo de glutamina, o un residuo de arginina, X ₇₄ es un residuo de alanina, un residuo de tirosina, un residuo de glutamina, o un residuo de serina, X ₇₅ es un residuo de leucina, un residuo de tirosina, o un residuo de asparagina, X ₇₆ es un residuo de glutamina, un residuo de serina, o un residuo de treonina, X ₇₇ es un residuo de treonina, un residuo de tirosina, o un residuo de isoleucina, X ₇₈ es un residuo de prolina o un residuo de serina,	

X₇₉ es un residuo de cisteína, un residuo de triptófano, un residuo de leucina, o un residuo de prolina, X₈₀ es un residuo de serina o un residuo de treonina	
Cadena Pesada	Secuencia CDR1
H5	G G S I N S - - F Y W S (SEQ ID NO:78)
H6	G G S F S A - - Y Y W S (SEQ ID NO:94)
H8	G G S I N S - - F Y W S (SEQ ID NO:126)
<u>H11</u>	<u>G G S I S S G G Y Y W S</u> (SEQ ID NO:174)
CONSENSO:	G G S X ₂₁ X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ Y W S
X₂₁ es un residuo de isoleucina o un residuo de fenilalanina X₂₂ es un residuo de asparagina o un residuo de serina X₂₃ es un residuo de serina o un residuo de alanina X₂₄ es un residuo de glicina o ningún residuo X₂₅ es un residuo de glicina o ningún residuo X₂₆ es un residuo de fenilalanina o un residuo de tirosina	
H7	G F T F I S Y G M H (SEQ ID NO:110)
H4	G Y T F T G Y Y I H
H2, H9	G F T F S S Y G M H (SEQ ID NO:30)
<u>H10</u>	<u>G Y S F T S Y W I G</u> (SEQ ID NO:158)
CONSENSO:	G X ₂₇ X ₂₈ F X ₂₉ X ₃₀ Y X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃
X₂₇ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina, X₂₈ es un residuo de treonina o un residuo de serina, X₂₉ es un residuo de treonina, un residuo de serina, o un residuo de isoleucina, X₃₀ es un residuo de glicina o un residuo de serina, X₃₁ es un residuo de tirosina, un residuo de glicina, o un residuo de triptófano, X₃₂ es un residuo de isoleucina o un residuo de metionina, X₃₃ es un residuo de histidina o un residuo de glicina	
H1	G Y T F T S Y G L S (SEQ ID NO:62)
H12	G F T F S A Y G M H (SEQ ID NO:190)
H3	G F T F S S Y W M S (SEQ ID NO:46)
<u>H13, H14</u>	<u>G Y T F T S Y G I S</u> (SEQ ID NO:206)
CONSENSO:	G X ₃₄ T F X ₃₅ X ₃₆ Y X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ (SEQ ID NO:140)

X₃₄ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina, X₃₅ es un residuo de treonina o un residuo de serina, X₃₆ es un residuo de serina o un residuo de alanina X₃₇ es un residuo de glicina o un residuo de triptófano, X₃₈ es un residuo de leucina, un residuo de metionina, o un residuo de isoleucina, X₃₉ es un residuo de serina o un residuo de histidina	
Cadena Pesada	Secuencia CDR2
H11	Y I S Y S G S T Y Y N P S L K S (SEQ ID NO:175)
H5	Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S (SEQ ID NO:79)
H6	E I N H S G G T N Y N P S L K S (SEQ ID NO:95)
H8	<u>Y I Y Y S G S T N Y N P S L K R</u> (SEQ ID NO:127)
CONSENSO:	X ₄₇ I X ₄₈ X ₄₉ S G X ₅₀ T X ₅₁ Y N P S L K X ₅₂ (SEQ ID NO:142)
X₄₇ es un residuo de tirosina o un residuo de glutamato, X₄₈ es un residuo de serina, un residuo de tirosina, o un residuo de asparagina, X₄₉ es un residuo de tirosina, o un residuo de histidina X₅₀ es un residuo de serina o un residuo de glicina, X₅₁ es un residuo de tirosina o un residuo de asparagina, X₅₂ es un residuo de serina o un residuo de arginina	
H2, H9	V I W Y D G S N K Y H A D S V K G (SEQ ID NO:31)
H12	V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G (SEQ ID NO:191)
H3	N I K Q D G S E E Y Y V D S V K G (SEQ ID NO:47)
H7	<u>V I W Y D G S T E Y Y A D S V K G</u> (SEQ ID NO:111)
CONSENSO:	X ₅₃ I X ₅₄ X ₅₅ D G S X ₅₆ X ₅₇ Y X ₅₈ X ₅₉ D S V K G (SEQ ID NO:179)
X₅₃ es un residuo de asparagina o un residuo de valina, X₅₄ es un residuo de triptófano o un residuo de lisina, X₅₅ es un residuo de tirosina o un residuo de glutamina, X₅₆ es un residuo de asparagina, un residuo de glutamato, o un residuo de serina, X₅₇ es un residuo de lisina, o un residuo de glutamato, X₅₈ es un residuo de histidina o un residuo de tirosina, X₅₉ es un residuo de alanina o un residuo de valina	
H4	W I N P N S G G T N Y A Q K F Q G

H1	W I I P Y N G N T N S A Q K L Q G (SEQ ID NO:63)
H13	W I S A Y N G N T N Y A Q K F Q G (SEQ ID NO:207)
H14	W I S P Y N G N T N Y A Q K F Q G
<u>H10</u>	<u>I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G</u> (SEQ ID NO:159)
CONSENSO:	X ₆₀ I X ₆₁ X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ T X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ X ₇₀ X ₇₁ X ₇₂ Q G (SEQ ID NO:180)
X₆₀ es un residuo de triptófano o un residuo de isoleucina, X₆₁ es un residuo de asparagina, un residuo de isoleucina, un residuo de serina, o un residuo de tirosina, X₆₂ es un residuo de prolina o un residuo de alanina, X₆₃ es un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de glicina, X₆₄ es un residuo de serina, un residuo de asparagina, o un residuo de aspartato, X₆₅ es un residuo de glicina o un residuo de serina, X₆₆ es un residuo de glicina, un residuo de asparagina, o un residuo de aspartato, X₆₇ es un residuo de asparagina o un residuo de arginina, X₆₈ es un residuo de tirosina o un residuo de serina, X₆₉ es un residuo de alanina o un residuo de serina X₇₀ es un residuo de glutamina o un residuo de prolina, X₇₁ es un residuo de lisina o un residuo de serina, X₇₂ es un residuo de fenilalanina o un residuo de leucina	
Cadena Pesada	Secuencia CDR3
H5, H8	- - D S I A A P F D Y (SEQ ID NO:80)
H6	V Q W L E L A Y F D Y (SEQ ID NO:96)
<u>H10</u>	<u>--- Q G L G F D Y</u> (SEQ ID NO:160)
CONSENSO:	X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ X ₉₀ X ₉₁ X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ FDY (SEQ ID NO:187)
X₈₇ es un residuo de valina o ningún residuo, X₈₈ es un residuo de glutamina o ningún residuo, X₈₉ es un residuo de aspartato, un residuo de triptófano, o ningún residuo, X₉₀ es un residuo de serina, un residuo de leucina, o ningún residuo, X₉₁ es un residuo de isoleucina, un residuo de glutamato, o un residuo de glutamina, X₉₂ es un residuo de alanina, un residuo de leucina, o un residuo de glicina, X₉₃ es un residuo de alanina o un residuo de leucina, X₉₄ es un residuo de prolina, un residuo de tirosina, o un residuo de glicina	
H13	D Q D Y Y D S S G W - G H (SEQ ID NO:208)

H14	D Q D Y Y D S S G W - D P (SEQ ID NO:224)
H11	- - A Y G D Y R G W F D P (SEQ ID NO:176)
CONSENSO:	X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ Y X ₉₈ D X ₉₉ X ₁₀₀ G W X ₁₀₁ X ₁₀₂ X ₁₀₃ (SEQ ID NO:188)
X₉₅ es un residuo de aspartato o ningún residuo, X₉₆ es un residuo de glutamina o ningún residuo, X₉₇ es un residuo de aspartato o un residuo de alanina, X₉₈ es un residuo de tirosina o un residuo de glicina, X₉₉ es un residuo de serina o un residuo de tirosina, X₁₀₀ es un residuo de serina o un residuo de arginina, X₁₀₁ es un residuo de fenilalanina o ningún residuo, X₁₀₂ es un residuo de glicina o un residuo de aspartato, X₁₀₃ es un residuo de histidina o un residuo de prolina	
H4	- - - D S G Y S S S W H F D Y -
H1	- - - D R D Y G V N Y D A F D I (SEQ ID NO:64)
H2	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V (SEQ ID NO:32)
H12	- S R N W N Y D S Y Q Y G L D V (SEQ ID NO:192)
H9	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V (SEQ ID NO:144)
H3	G S S S W Y Y - Y N G M D V -
H7	- E R Q W L Y - - H Y G M D V (SEQ ID NO:112)
CONSENSO:	X ₁₀₄ X ₁₀₅ X ₁₀₆ X ₁₀₇ X ₁₀₈ X ₁₀₉ YX ₁₁₀ X ₁₁₁ X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈)
X₁₀₄ es un residuo de glicina o ningún residuo X₁₀₅ es un residuo de serina, un residuo de glutamato, o ningún residuo X₁₀₆ es un residuo de arginina, un residuo de serina, o ningún residuo, X₁₀₇ es un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de serina, o un residuo de glutamina X₁₀₈ es un residuo de serina, un residuo de arginina, o un residuo de triptófano, X₁₀₉ es un residuo de glicina, un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de leucina, X₁₁₀ es un residuo de serina, un residuo de glicina, un residuo de aspartato, o ningún residuo, X₁₁₁ es un residuo de serina, un residuo de valina, un residuo de asparagina, o un residuo de tirosina, X₁₁₂ es un residuo de serina, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina, o un residuo de histidina X₁₁₃ es un residuo de triptófano, un residuo de tirosina, o un residuo de glutamina, X₁₁₄ es un residuo de histidina, un residuo de aspartato, un residuo de tirosina, o ningún residuo, X₁₁₅ es un residuo de fenilalanina, un residuo de alanina, o un residuo de glicina,	

X₁₁₆ un residuo de aspartato, un residuo de fenilalanina, un residuo de leucina, o un residuo de metionina

X₁₁₇ un residuo de tirosina, o un residuo de aspartato,

X₁₁₈ es un residuo de isoleucina, un residuo de valina, o ningún residuo

La presente descripción proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia de un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en L1 a L14 sólo en 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 residuos, en el que cada tal diferencia de secuencia es independientemente una delección, inserción, o sustitución de un residuo de aminoácido. En otra realización, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ó 99% idéntica a la secuencia de un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en L1-L14. En otra realización, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ó 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en L1-L14 (que incluye L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, y L14). En otra realización, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con el complemento de un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en L1-L14. En otra realización, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con el complemento de un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en L1-L14. En otra realización, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con un complemento de un polinucleótido de cadena ligera de L1-L14.

En otra realización, la presente descripción proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia de un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H1 a H14 sólo en 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 residuo(s), en el que cada tal diferencia de secuencia es independientemente una delección, inserción, o sustitución de un residuo de aminoácido. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ó 99% idéntica a la secuencia de un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H1-H14. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ó 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H1-H14. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con el complemento de un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H1-H14. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con el complemento de un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H1-H14. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones moderadamente astringentes con un complemento de un polinucleótido de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO:10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 136, 154, 170, 186, 202, y 218.

Las proteínas de unión a antígeno particulares descritas comprenden una o más secuencias de aminoácidos que son idénticas a las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR y/o FR referenciadas en la presente memoria, por ejemplo, una o más CDR o FR de una o más de SEQ ID Nos: 9-16, 22, 25-32, 36, 41-48-57-62, 64, 73-80, 89-91, 93-96, 105-107, 109-112, 115, 116, 121-128, 131, 132, 134, 137-142, 144, 153-160, 169-176, 179, 180, 185-192, 201-208, 217-220, y 223. En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR2 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR3 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR2 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR1 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR2 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR3 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR4 de cadena ligera ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR1 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión

a antígeno comprende una secuencia FR2 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR3 de cadena pesada ilustrada anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia FR4 de cadena pesada ilustrada anteriormente.

- 5 En una realización, la presente descripción proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende una o más secuencias CDR que se diferencian de una secuencia CDR mostrada anteriormente en no más de 5, 4, 3, 2, ó 1 residuos de aminoácidos.

- En otra realización, al menos una de las secuencias CDR3 de la proteína de unión a antígeno es una secuencia CDR3 de A1-A14, como se muestra en la Tabla 1 o Tabla 2. En otra realización, la secuencia CDR3 de cadena ligera de la proteína de unión a antígeno es una secuencia CDR3 de cadena ligera de A1-A14 como se muestra en la Tabla 1 y la secuencia CDR3 de cadena pesada de la proteína de unión a antígeno es una secuencia de cadena pesada de A1-A14 como se muestra en la Tabla 2. En otra realización, la proteína de unión a antígeno comprende 1, 2, 3, 4, ó 5 secuencia(s) de CDR que cada una se diferencia independientemente en 6, 5, 4, 3, 2, 1, ó 0 adiciones, sustituciones, y /o deleciones únicas de aminoácidos de una secuencia CDR de A1-A14, y la proteína de unión a antígeno comprende además 1, 2, 3, 4, ó 5 secuencia(s) CDR que cada una se diferencia independientemente en 6, 5, 4, 3, 2, 1, ó 0 adiciones, sustituciones, y /o deleciones únicas de aminoácidos de una secuencia CDR.

Las CDR de cadena ligera de los anticuerpos A1-A14 se muestran a continuación en la Tabla 1, y las CDR de cadena pesada de los anticuerpos A1-A14 se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 1

Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
A1	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO:11)	QDSKRPS (SEQ ID NO:12)	QAWDSSTAV (SEQ ID NO:13)
A2	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO:27)	AASSLQS (SEQ ID NO:28)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO:29)
A3	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:43)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	RQQNTYPLT (SEQ ID NO:45)
A4	RSSQSLHSTGYNLYD	LGSFRAS	MQALQTPCS
A5	KSSQSILYSSNNKKYLV (SEQ ID NO:75)	WTSMRES (SEQ ID NO:76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO:77)
A6	RASQSISNYLN (SEQ ID NO:91)	ATSSLQS (SEQ ID NO:92)	QQSYSISPT (SEQ ID NO:93)
A7	RAGQGIRNDLV (SEQ ID NO:107)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNTYPFT (SEQ ID NO:109)
A8	KSSQSILYSSNNKKYLV (SEQ ID NO:75)	WTSMRES (SEQ ID NO:76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO:125)
A9	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO:27)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO:141)
A10	SGEKWGEKYAC (SEQ ID NO:155)	QDTKRPS (SEQ ID NO:156)	QAWDRSTV (SEQ ID NO:157)
A11	SGDKLGDKFAF (SEQ ID NO:711)	QDNKRPS (SEQ ID NO:172)	QAWDSSTVV (SEQ ID NO:173)
A12	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:43)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNSYTWT (SEQ ID NO:189)
A13	SGDKLGDKYVC (SEQ ID NO:203)	LDNKRPS (SEQ ID NO:204)	QAWDSSTV (SEQ ID NO:205)
A14	SGDKLGDKYAF (SEQ ID NO:219)	HDTKRPS (SEQ ID NO:220)	QAWDSSTV (SEQ ID NO:205)

Tabla 2

Cadena Pesada			
Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
A1	GYTFTSYGLS (SEQ ID NO:62)	WIIPYNGNTNSAQKLQ G (SEQ ID NO:63)	DRDYGVNYDAFDI (SEQ ID NO:64)
A2	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:30)	VIWYDGSNKYHADSV KG (SEQ ID NO:31)	SRNWNVDNYYYGL DV (SEQ ID NO:32)
A3	GFTFSSYWMS (SEQ ID NO:46)	NIKQDGSSEYYVDSVK G (SEQ ID NO:47)	GSSSWYYYNYGMD V (SEQ ID NO:48)
A4	GYTFTGYIHI	WINPNSGGTNYAQKF QG	DSGYSSSWHFDY
A5	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:78)	YIYYSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:79)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO:80)
A6	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:94)	EINHSGGTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:95)	VQWLELAYFDY (SEQ ID NO:96)
A7	GFTFISYGMH (SEQ ID NO:110)	VIWYDGSSTEYYADSV KG (SEQ ID NO:111)	ERQWLYHYGMDV (SEQ ID NO:112)
A8	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:126)	YIYYSGSTNYPNPSLKR (SEQ ID NO:127)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO:80)
A9	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:30)	VIWYDGSNKYHADSV KG (SEQ ID NO:31)	SRNWNVDNYYYGL DV (SEQ ID NO:144)
A10	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO:158)	IYPGDS DTRYSPSFQG (SEQ ID NO:159)	QGLGFDY (SEQ ID NO:160)
A11	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO:174)	YISYSGSTYYPNPSLKS (SEQ ID NO:175)	AYGDYRGWFDP (SEQ ID NO:176)
A12	GFTFSAYGMH (SEQ ID NO:190)	VIWYDGSNKYYADSV KG (SEQ ID NO:191)	SRNWNVDNYYYGL DV (SEQ ID NO:192)
A13	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO:206)	WISAYNGNTNYAQKF QG (SEQ ID NO:207)	DQDYDSSGWGH (SEQ ID NO:208)
A14	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO:206)	WISPYNGNTNYAQKF QG (SEQ ID NO:223)	DQDYDSSGWDP (SEQ ID NO:224)

5 Las secuencias de nucleótidos de A1-A14, o las secuencias de aminoácidos de A1-A14, pueden alterarse, por ejemplo, por mutagénesis aleatoria o por mutagénesis dirigida a sitio (por ejemplo, mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótido) para crear un polinucleótido alterado que comprende una o más sustituciones, deleciones, o inserciones de nucleótidos particulares comparado con el polinucleótido no mutado. Los ejemplos de técnicas para hacer dichas alteraciones se describen en Walder et al., 1986, Gene 42:133; Bauer et al. 1985, Gene 37:73; Craik, BioTechniques, enero 1985, 12-19; Smith et al., 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; y en las Patentes U.S. Nos. 4.518.584 y 4.737.462. Éstos y otros métodos pueden usarse para preparar, por ejemplo, derivados de anticuerpos anti-activina A que tienen una propiedad deseada, por ejemplo, afinidad, avidez, o especificidad incrementadas para activina A, actividad o estabilidad incrementadas *in vivo* o *in vitro*, o efectos secundarios reducidos *in vivo* comparado con el anticuerpo sin derivatizar.

10

Otros derivados de anticuerpos anti-activina A en el alcance de esta descripción incluyen conjugados covalentes o por agregación de anticuerpos anti-activina A, o fragmentos de éstos, con otras proteínas o polipéptidos, tal como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados con el extremo N o extremo C de un polipéptido de anticuerpo anti-activina A. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal (o líder) heterólogo, por ejemplo, el líder del factor alfa de levaduras, o un péptido tal como una etiqueta de epítipo. Las proteínas de fusión que contienen la proteína de unión a antígeno pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, poli-His). Una proteína de unión a antígeno también puede unirse al péptido FLAG Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:226) como se describe en Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, y la Patente U.S. 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico (mAb), permitiendo un ensayo rápido y purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en los que el péptido FLAG se fusiona con un polipéptido dado están disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

Los oligómeros que contienen una o más proteínas de unión a antígeno pueden emplearse como antagonistas de la activina A. Los oligómeros pueden estar en la forma de dímeros, trímeros, u oligómeros superiores unidos covalentemente o unidos no covalentemente. Los oligómeros que comprenden dos o más proteínas de unión a antígeno se contemplan para uso, con un ejemplo siendo un homodímero.

Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

Una realización está dirigida a oligómeros que comprenden múltiples proteínas de unión a antígeno unidas mediante interacciones covalentes o no covalentes entre restos peptídicos fusionados con las proteínas de unión a antígeno. Dichos péptidos pueden ser conectores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de estimular la oligomerización. Las cremalleras de leucina y determinados polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden estimular la oligomerización de proteínas de unión a antígeno unidas a ellos, como se describe con más detalle más adelante.

En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden de dos a cuatro proteínas de unión a antígeno. Las proteínas de unión a antígeno del oligómero pueden estar en cualquier forma, tal como cualquiera de las formas descritas anteriormente, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden proteínas de unión a antígeno que tienen actividad de unión de activina A.

En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados con varias partes de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc) se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 *Curr. Prot.s in Immunol.*, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11.

Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creado por fusión de un fragmento de unión a activina A de un anticuerpo anti-activina A con la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede prepararse, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble como moléculas de anticuerpo, después de lo cual se forman enlaces disulfuro intercadena entre los restos Fc para rendir el dímero.

El término "polipéptido Fc" tal y como se usa en la presente memoria incluye formas nativas y de muteína de los polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen las formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que estimula la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de éstos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena única que se extiende desde la región bisagra N terminal al extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína de Fc descrita en la Patente U.S. 5.457.035 y en Baum et al., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína presenta una afinidad reducida por los receptores Fc.

En otras realizaciones, la parte variable de las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-activina A pueden sustituirse por la parte variable de una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples proteínas de unión a antígeno, con o sin conectores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los conectores peptídicos adecuados están los descritos en las Patentes U.S. 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar proteínas de unión a antígeno oligoméricas implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que estimulan la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y desde entonces se han encontrado en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos naturales y derivados de éstos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína tensioactiva de pulmón D (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada con ella se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En una estrategia, proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento de anticuerpo anti-activina A o derivado fusionado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped adecuadas, y los fragmentos de anticuerpo anti-activina A oligoméricos solubles o derivados que se forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno que interfieren con la unión de activina A con el receptor de activina A. Dichas proteínas de unión a antígeno puede prepararse frente a activina A, o un fragmento, variante o derivado de ésta, y cribarse en ensayos convencionales para la capacidad de interferir con la unión de activina A al receptor de activina A. Los ejemplos de ensayos adecuados son ensayos que ensayan las proteínas de unión a antígeno para la capacidad de inhibir la unión de activina A a células que expresan el receptor de activina A, o que ensayan las proteínas de unión a antígeno para la capacidad de reducir una respuesta biológica o celular que resulta de la unión de activina A a los receptores de activina A de la superficie celular. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 10, así como en los Ejemplos más adelante, pueden cribarse anticuerpos según su capacidad de unirse a superficies de anticuerpo inmovilizado (activina A y/o activina B).

Los fragmentos de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno de la invención pueden producirse por técnicas convencionales. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero no están limitados a, fragmentos Fab y F(ab')₂. También se contemplan los fragmentos de anticuerpo y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética.

Las realizaciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, murinos). Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse por técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende el dominio variable de un anticuerpo murino (o todo o parte del sitio de unión a antígeno de éste) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y más modificados por ingeniería incluyen los descritos en Riechmann et al., 1988, Nature 332:323, Liu et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, Larrick et al., 1989, Bio/Technology 7:934, y Winter et al., 1993, TIPS 14:139. En una realización, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo injertado con CDR. Las técnicas para humanizar anticuerpos se discuten, por ejemplo, en las Pat. U.S. Nos. 5.869.619, 5.225.539, 5.821.337, 5.859.205, 6.881.557, Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39, y Tamura et al., 2000, J. Immunol. 164:1432-41.

Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos humanos o parcialmente humano en animales no humanos. Por ejemplo, se han preparado ratones en los que uno o más genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado por varios medios. Los genes de inmunoglobulina humana se han introducido en los ratones para reemplazar los genes de ratón inactivados. Los anticuerpos producidos en el animal incorporan cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal. En una realización, un animal no humano, tal como un ratón transgénico, se inmuniza con un polipéptido de activina A, de manera que se generan en el animal anticuerpos dirigidos frente al polipéptido de activina A.

Un ejemplo de un inmunógeno adecuado es una activina A humana soluble, tal como un polipéptido que comprende el dominio extracelular de la proteína de SEQ ID NO:225, u otro fragmento inmunogénico de la proteína de SEQ ID NO:225. Los ejemplos de técnicas para la producción y uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos o parcialmente humanos se describen en las Patentes U.S. 5.814.318, 5.569.825, y 5.545.806, Davis et al., 2003, Production of human antibodies from transgenic mice en Lo, ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ:191-200, Kellermann et al., 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97, Russel et al., 2000, Infect Immun. 68:1820-26, Gallo et al., 2000, Eur J Immun. 30:534-40, Davis et al., 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25, Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23, Jakobovits, 1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31:33-42, Green et al., 1998, J Exp Med. 188:483-95, Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14, Tsuda et al., 1997, Genomics. 42:413-21, Mendez et al., 1997, Nat Genet. 15:146-56, Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761-63, Arbones et al., 1994, Immunity. 1:247-60, Green et al., 1994, Nat Genet. 7:13-21, Jakobovits et al., 1993, Nature. 362:255-58, Jakobovits et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA. 90: 2551-55. Chen, J., M. Trounstein, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar. Inter'l Immunol. 5 (1993): 647-656, Choi et al., 1993, Nature Genetics 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, Nature Biotech. 14: 845-51, Harding et al., 1995, Annals of the New York Academy of Sciences, Lonberg et al., 1994, Nature 368: 856-59, Lonberg, 1994, Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies en Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, Internal Review of

Immunology 13: 65-93, Neuberger, 1996, Nature Biotechnology 14: 826, Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, Inter'l Immunol. 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 97: 722-27, Tuailon et al., 1993, Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 3720-24, y Tuailon et al., 1994, J. Immunol. 152: 2912-20.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a activina A. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo inmortalizando células de bazo recogidas del animal transgénico después de terminar el esquema de inmunización. Las células de bazo pueden inmortalizarse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para uso en procedimientos de fusión que producen hibridomas preferiblemente no son productoras de anticuerpos, tienen una eficiencia de fusión alta, y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en determinados medios selectivos que apoyan el crecimiento sólo de las células fusionadas deseadas (hibridomas). Los ejemplos de líneas celulares adecuadas para uso en las fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; los ejemplos de líneas celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En una realización, se produce una línea celular de hibridoma inmunizando un animal (por ejemplo, un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno activina A; recogiendo células del bazo del animal inmunizado; fusionando las células de bazo recogidas con una línea celular de mieloma, generando de esta manera células de hibridoma; estableciendo líneas celulares de hibridoma, e identificando una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido activina A. Dichas líneas celulares de hibridoma, y anticuerpos monoclonales anti-activina A producidos por ellas, están englobadas por la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden purificarse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Los hibridomas o mAb pueden cribarse adicionalmente para identificar los mAb con propiedades particulares, tales como la capacidad de bloquear una actividad inducida por la activina A. Los ejemplos de dichos cribados se proporcionan en los ejemplos siguientes.

La evolución molecular de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en el centro del sitio de unión del anticuerpo también se ha usado para aislar anticuerpos con afinidad incrementada, por ejemplo, anticuerpos que tienen afinidad incrementada para c-erbB-2, como se describe por Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:551. De acuerdo con esto, dichas técnicas son útiles para preparar anticuerpos frente a la activina A.

Las proteínas de unión a antígeno dirigidas frente a una activina A pueden usarse, por ejemplo, en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos de activina A, bien *in vitro* o *in vivo*. Las proteínas de unión a antígeno también pueden emplearse para purificar proteínas de activina A mediante cromatografía de inmunoafinidad. Las proteínas de unión a antígeno que además pueden bloquear la unión de la activina A también pueden usarse para inhibir una actividad biológica que resulta de dicha unión. Las proteínas de unión a antígeno bloqueantes pueden usarse en los métodos de la presente invención. Dichas proteínas de unión a antígeno que funcionan como antagonistas de la activina A pueden emplearse para tratar cualquier afección relacionada con la activina A, incluyendo pero no limitado a caquexia. En una realización, se emplea un anticuerpo monoclonal anti-activina A humana generado por los procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos para tratar dichas afecciones.

Aunque los anticuerpos humanos, parcialmente humanos, o humanizados serán adecuados para muchas aplicaciones, particularmente las que implican la administración del anticuerpo a un sujeto humano, otros tipos de proteínas de unión a antígeno serán adecuadas para determinadas aplicaciones. Los anticuerpos no humanos de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, de cualquier animal que produce anticuerpos, tal como ratón, rata, conejo, cabra, burro, o primate no humano (tal como mono (por ejemplo, mono cinomolgus o resus) o simio (por ejemplo, chimpancé)). Los anticuerpos no humanos de la invención pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones basadas en cultivo celular *in vitro*, o en cualquier otra aplicación en la que no se produce una respuesta inmune al anticuerpo de la invención, es insignificativa, puede evitarse, no es un problema, o se desea. En una realización, un anticuerpo no humano de la invención se administra a un sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano no incita una respuesta inmune en el sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano es de la misma especie que el sujeto no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón de la invención se administra a un ratón. Un anticuerpo de una especie particular puede prepararse, por ejemplo, inmunizando un animal de esa especie con el inmunógeno deseado (por ejemplo, un polipéptido de activina A soluble) o usando un sistema artificial para generar anticuerpos de esa especie (por ejemplo, un sistema basado en bacterias o presentación en fagos para generar anticuerpos de una especie particular), o convirtiendo un anticuerpo de una especie en un anticuerpo de otra especie reemplazando, por ejemplo, la región constante del anticuerpo por una región constante de otra especie, o reemplazando uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo de manera que sea más parecido a la secuencia de un anticuerpo de la otra especie. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpos de dos o más especies diferentes.

Las proteínas de unión a antígeno pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden purificarse a partir de células que las expresan de forma natural (por ejemplo, un anticuerpo puede purificarse a partir de un hibridoma que lo produzca), o producirse en sistemas de expresión recombinantes, usando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Puede usarse cualquier sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido deseado. Entre las células huésped que pueden emplearse están células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10: 2821. Los vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura, y mamíferos se describen por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985).

Las células transformadas pueden cultivarse en condiciones que estimulen la expresión del polipéptido, y el polipéptido puede recuperarse por procedimientos convencionales de purificación de proteínas. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, sobre una matriz que tiene unida a ella toda o parte (por ejemplo, el dominio extracelular) de la activina A. Los polipéptidos contemplados para uso en la presente memoria incluyen polipéptidos de anticuerpo anti-activina A de mamífero recombinantes sustancialmente homogéneos que carecen sustancialmente de materiales endógenos contaminantes.

Las proteínas de unión a antígeno pueden prepararse, y cribarse para propiedades deseadas, por cualquiera de varias técnicas conocidas. Algunas de las técnicas implican el aislamiento de un ácido nucleico que codifica una cadena de polipéptido (o parte de ésta) de una proteína de unión a antígeno de interés (por ejemplo, un anticuerpo anti-activina A), y la manipulación del ácido nucleico mediante tecnología de ADN recombinante. El ácido nucleico puede fusionarse con otro ácido nucleico de interés, o alterarse (por ejemplo, por mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, deleccionar, o sustituir uno o más residuos de aminoácidos, por ejemplo.

En un aspecto, la presente invención proporciona fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo anti-activina A de la invención. Dichos fragmentos pueden consistir enteramente en secuencias derivadas de anticuerpo o pueden comprender secuencias adicionales. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, F(ab')₂, anticuerpos de cadena única, fragmentos divalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes, y anticuerpos de dominio. Otros ejemplos se proporcionan en Lund et al., 2002, *Biochem. Soc. Trans.* 30:500-06.

Los anticuerpos de cadena única pueden formarse uniendo fragmentos del dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) mediante un puente de aminoácido (conector peptídico corto), lo que resulta en una única cadena de polipéptido. Dichos Fvs de cadena única (scFv) se han preparado fusionando ADN que codifica un conector peptídico entre ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse sobre sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, o tetrámeros), dependiendo de la longitud de un conector flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Combinando diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H, se pueden formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena única incluyen las descritas en la Patente U.S. No. 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544, de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87. Los anticuerpos de cadena única derivados de anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, scFv que comprenden las combinaciones de dominio variable L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14.

Las proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo) de la invención pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, regiones constantes de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma, o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma, o mu humana. En una realización, la región constante de cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante, o muteína de una región constante natural.

Se conocen técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir, intercambio de subclase. Así, los anticuerpos IgG pueden derivar de un anticuerpo IgM, por ejemplo, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a

antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo parental), pero también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente del del anticuerpo parental. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. El ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares puede emplearse en dichos procedimientos, por ejemplo, ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase también Lantto et al., 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16.

Una proteína de unión a antígeno comprende el dominio de cadena pesada de IgG1 de cualquiera de A1-A14 (H1-H14) o un fragmento del dominio de cadena pesada de IgG1 de cualquiera de A1-A14 (H1-H14). Otra proteína de unión a antígeno de la invención comprende la región de cadena constante de cadena ligera kappa de A1-A14 (L1-L14), o un fragmento de la región constante de cadena ligera kappa de A1-A14 (L1-L14). Otra proteína de unión a antígeno de la invención comprende tanto el dominio de cadena pesada de IgG1, o un fragmento de éste, de A1-A14 (L1-L14) como el dominio de cadena ligera kappa, o un fragmento de éste, de A1-A14 (L1-L14).

De acuerdo con esto, las proteínas de unión a antígeno descritas incluyen las que comprenden, por ejemplo, las combinaciones de dominio variable L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14, que tienen un isotipo deseado (por ejemplo, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, e IgD) así como fragmentos Fab o F(ab')₂ de éstas. Además, si se desea una IgG4, también se puede desear introducir una mutación puntual (CPSCP -> CPPCP) en la región bisagra como se describe en Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6:407) para aliviar la tendencia de formar enlaces disulfuro intra cadena H que pueden dar lugar a heterogeneidad en los anticuerpos IgG4.

La proteína de unión a antígeno tiene una K_{off} de 1x10⁻⁴ s⁻¹ o menor. En otra realización, la K_{off} es 5x10⁻⁵ s⁻¹ o menor. En otra realización, la K_{off} es sustancialmente la misma que un anticuerpo que tiene una combinación de secuencias de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada seleccionado del grupo de combinaciones que consiste en L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14. En otra realización, la proteína de unión a antígeno se une a la activina A con sustancialmente la misma K_{off} que un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo que tiene una combinación de secuencias de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada seleccionado del grupo de combinaciones que consiste en L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, y L14H14. En otra realización, la proteína de unión a antígeno se une a la activina A con sustancialmente la misma K_{off} que un anticuerpo que comprende una de las secuencias de aminoácidos ilustradas anteriormente. En otra realización, la proteína de unión a antígeno se une a la activina A con sustancialmente la misma K_{off} que un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo que comprende una de las secuencias de aminoácidos ilustradas anteriormente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término activina A humana se pretende que incluya la proteína de SEQ ID NO:1 y las variantes alélicas de ésta. La activina A puede purificarse a partir de las células huésped que se han transfectado con un gen que codifica activina A por elución del sobrenadante filtrado del fluido de cultivo de la célula huésped usando una columna Heparina HP, usando un gradiente de sal.

El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión de éste. Un anticuerpo puede comprender una molécula completa de anticuerpo (incluyendo versiones policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas, o humanas que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa), o comprender un fragmento de unión a antígeno de éste. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc, y Fd, y pueden incorporarse en anticuerpos de dominio único, anticuerpos de cadena única, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, fragmentos divalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes, v-NAR y bis-scFv (Véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.*, 23, 9, 1126-1136). Los polipéptidos de anticuerpo también se describen en la Patente U.S. No. 6,703,199, incluyendo monocuerpos de polipéptido de fibronectina. Otros polipéptidos de anticuerpo se describen en la Publicación de Patente U.S. 2005/0238646, que son polipéptidos de cadena única.

Los fragmentos de unión a antígeno derivados de un anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo, digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos según métodos convencionales. Como ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueante para los grupos sulfidrilos que resultan de la escisión de uniones disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática usando papaína produce dos fragmentos monovalentes Fab y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patente U.S. No. 4.331.647, Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., en *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967); y por Andrews, S.M. y Titus, J.A. en *Current Protocols in Immunology* (Coligan J.E., et al., eds), John Wiley & Sons, Nueva York (2003), páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10A.1-2.10A.5. También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separar cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes (Fd), escindir adicionalmente fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Un fragmento de anticuerpo también puede ser cualquier proteína sintética o preparada por ingeniería genética. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variables de cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptido de cadena única recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico (proteínas scFv).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo. Las CDR (también denominadas "unidades mínimas de reconocimiento", o "región hipervariable") pueden obtenerse construyendo polinucleótidos que codifican la CDR de interés. Dichos polinucleótidos se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable usando ARNm de células productoras de anticuerpo como un molde (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Así, en una realización, el agente de unión comprende al menos una CDR como se describe en la presente memoria. El agente de unión puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR como se describe en la presente memoria. El agente de unión puede comprender además al menos un dominio de región variable de un anticuerpo descrito en la presente memoria. El dominio de región variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos y comprenderá generalmente al menos una secuencia de CDR responsable de la unión a activina A humana, por ejemplo, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 y/o las CDR de cadena ligera descritas específicamente en la presente memoria y que es adyacente a o está en marco con una o más secuencias marco. En términos generales, el dominio de región variable (V) puede ser cualquier organización adecuada de dominios variables de cadena pesada (V_H) y/o ligera (V_L) de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, el dominio de la región V puede ser monomérico y ser un dominio V_H o V_L , que es capaz de unirse independientemente a activina A humana con una afinidad al menos igual a $1 \times 10^{-7}M$ o o menos como se describe más adelante. Alternativamente, el dominio de la región V puede ser dímérico y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L , o V_L - V_L . El dímero de la región V comprende al menos una cadena V_H y al menos una cadena V_L que puede estar asociada no covalentemente (referido de aquí en adelante como F_v). Si se desea, las cadenas pueden acoplarse covalentemente bien directamente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro entre los dos dominios variables, o mediante un conector, por ejemplo, un conector peptídico, para formar un F_v de cadena única (scFv).

El dominio de región variable puede ser cualquier dominio variable natural o una versión preparada por ingeniería de éste. Por versión preparada por ingeniería se quiere decir un dominio de región variable que se ha creado usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Dichas versiones preparadas por ingeniería incluyen aquellas creadas, por ejemplo, a partir de una región variable de anticuerpo específico por inserciones, deleciones, o cambios en o a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo específico. Los ejemplos particulares incluyen dominios de región variable preparados por ingeniería que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos marco de un primer anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo.

El dominio de región variable puede unirse covalentemente en un aminoácido C-terminal al menos a otro dominio de anticuerpo o un fragmento de éste. Así, por ejemplo, un dominio V_H que está presente en el dominio de región variable puede unirse a un dominio CH1 de inmunoglobulina, o un fragmento de éste. De manera similar, un dominio V_L puede unirse a un dominio C_K o un fragmento de éste. De esta manera, por ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión a antígeno contiene asociados dominios V_H y V_L unidos covalentemente en sus extremos C a un dominio CH1 y C_K , respectivamente. El dominio CH1 puede extenderse con más aminoácidos, por ejemplo para proporcionar una región bisagra o una parte de un dominio de región bisagra como se encuentra en un fragmento Fab', o para proporcionar dominios adicionales, tales como dominios CH2 y CH3 de anticuerpo.

Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos comprenden una de estas CDR. Por ejemplo, una o más CDR pueden incorporarse en las regiones marco conocidas de anticuerpo (IgG1, IgG2, etc.), o conjugarse con un vehículo adecuado para aumentar la vida media de éstos. Los vehículos adecuados incluyen, pero no están limitados a Fc, polietilén glicol (PEG), albúmina, transferrina, y semejantes. Éstos y otros vehículos adecuados se conocen en la técnica. Dichos péptidos CDR conjugados pueden estar en forma monomérica, dimérica, tetramérica, u otra. En una realización, uno o más polímeros solubles en agua están unidos en una o más posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino, de un agente de unión.

En determinadas realizaciones preferidas, un anticuerpo comprende una o más uniones de polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a, polietilén glicol, polioxietilén glicol, o propilén glicol. Véase, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. En determinadas realizaciones, un agente de unión derivado comprende uno o más de monometoxi-polietilén glicol, dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en carbohidrato, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilén glicol, homopolímeros de propilén glicol, un copolímero de polipropilén óxido/etilén óxido, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y polivinil alcohol, así como mezclas de dichos polímeros. En determinadas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua se unen

aleatoriamente a una o más cadenas laterales. En determinadas realizaciones, PEG puede actuar para mejorar la capacidad terapéutica para un agente de unión, tal como un anticuerpo. Determinados de dichos métodos se discuten, por ejemplo en Pat. U.S. No. 6.133.426.

Se apreciará que un anticuerpo de la presente invención puede tener al menos una sustitución de aminoácido, siempre que el anticuerpo retenga especificidad de unión. Por lo tanto, las modificaciones a las estructuras de anticuerpo están englobadas en el alcance de la invención. Éstas pueden incluir sustituciones de aminoácidos, que pueden ser conservativas o no conservativas, que no destruyen la capacidad de unión a activina A de un anticuerpo. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden englobar residuos de aminoácidos no naturales, que se incorporan típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formar reversas o invertidas de restos de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos conservativa también puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo normativo de manera que hay poco efecto o no lo hay en la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una clase de aminoácidos o miméticos de aminoácidos por un miembro de otra clase con propiedades físicas diferentes (por ejemplo, tamaño, polaridad, hidrofobicidad, carga). Dichos residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas a anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Además, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una única sustitución de aminoácidos en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden cribarse usando ensayos de actividad conocidos para los expertos en la técnica. Dichas variantes podrían usarse para recoger información acerca de variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácidos particular resulta en una actividad destruida, reducida de manera indeseada, o no adecuada, las variantes con dicho cambio pueden evitarse. En otras palabras, tomando como base la información recogida de dichos experimentos rutinarios, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse más sustituciones bien solas o en combinación con otras mutaciones.

Un experto en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas del polipéptido como se muestra en la presente memoria usando técnicas muy conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad tomando como diana regiones que se cree que no son importantes para la actividad. En determinadas realizaciones, se puede identificar residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura del polipéptido.

Además, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. A la vista de dicha comparación, se puede predecir la importancia de residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones con aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos que se predice son importantes.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. A la vista de dicha información, un experto en la técnica puede predecir el alineamiento de residuos de aminoácidos de un anticuerpo respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se predice están en la superficie de la proteína, ya que dichos residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas.

Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de estructura secundaria. Véase Moulton J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou et al., Biochem., 13(2):222-245 (1974); Chou et al., Biochem., 113(2):211-222 (1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou et al., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Además, están disponibles actualmente programas informáticos para ayudar en la predicción de la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor de 30%, o similitud mayor de 40% frecuentemente tienen topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado una capacidad de predicción aumentada de estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos en la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dado y que una vez se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural será dramáticamente más exacta.

Los métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "reconocimiento de plegamiento" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., *Structure*, 4(1):15-19 (1996)), "análisis de perfil" (Bowie et al., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)), y "vínculo evolutivo" (Véase Holm, supra (1999), y Brenner, supra (1997)).

- 5 En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpos incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o tipo de sitio de glicosilación se ha alterado comparado con las secuencias de aminoácidos de un polipéptido parental. En determinadas realizaciones, las variantes comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos por N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido por N se caracteriza por la
- 10 secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato unida por N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato unida por N existente. También se proporciona una reorganización de cadenas de carbohidrato unidas por N en las que uno o más sitios de glicosilación unidos por N (típicamente aquellos que son naturales) se eliminan y se crean uno o más nuevos
- 15 sitios unidos por N. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína se delecionan de o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) comparado con la secuencia de aminoácidos parental. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben replegarse en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de los cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y
- 20 típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas no emparejadas.

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) pueden determinarse por los expertos en la técnica en el momento en el que se deseen dichas sustituciones. En determinadas realizaciones, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes de anticuerpos de activina A, o para incrementar o disminuir la afinidad de los anticuerpos para activina A descritos en la presente memoria.

- 25 Según determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteína, (4) alteran las afinidades de unión, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en dichos polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido que está fuera del o de los dominios que forman contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa típicamente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan a la secuencia parental). Los
- 30 ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

- 40 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden unirse químicamente a polímeros, lípidos, u otros restos.

- Los agentes de unión pueden comprender al menos una de las CDR descritas en la presente memoria incorporada en una estructura marco biocompatible. En un ejemplo, la estructura marco biocompatible comprende un polipéptido o parte de éste que es suficiente para formar un soporte estructural conformacionalmente estable, o marco, o soporte, que es capaz de exponer una o más secuencias de aminoácidos que se unen a un antígeno (por ejemplo, CDR, una región variable, etc.) en una región de superficie localizada. Dichas estructuras pueden ser un polipéptido natural o "plegamiento" de polipéptido (un resto estructural), o pueden tener una o más modificaciones, tales como adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos, respecto a un polipéptido o plegamiento natural. Estos soportes pueden derivar de un polipéptido de cualquier especie (o de más de una especie), tal como ser humano, otro mamífero, otro vertebrado, invertebrado, planta, bacteria o virus.

- 50 Típicamente, las estructuras marco biocompatibles se basan en soportes o esqueletos de proteína distintos de dominios de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden usarse las basadas en fibronectina, anquirina, lipocalina, neocarcinostaina, citocromo b, dedo de cinc CP1, PST1, superhélice, LACI-D1, dominio Z y dominios tendamistat (Véase, por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997, *Curr. Opin. in Struct. Biol.*, 7, 463-469).

- 55 Se apreciará que los anticuerpos de la invención incluyen los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria. Los anticuerpos humanizados tales como los descritos en la presente memoria pueden producirse usando técnicas conocidas para los expertos en la técnica (Zhang, W., et al., *Molecular Immunology*, 42(12):1445-1451, 2005; Hwang W. et al., *Methods*, 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua WF, et al., *Methods* 36(1):43-60, 2005; y Clark, M., *Immunology Today*, 21(8):397-402, 2000).

Además, un experto en la técnica reconocerá que los agentes de unión adecuados incluyen partes de estos anticuerpos, tales como uno o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 como se describe específicamente en la presente memoria. Al menos una de las regiones de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 puede tener al menos una sustitución de aminoácidos, siempre que el anticuerpo retenga la especificidad de unión de la CDR no sustituida. La parte no CDR del anticuerpo puede ser una molécula distinta de proteína, en el que el agente de unión bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo descrito en la presente memoria a activina A y/o neutraliza la activina A. La parte no CDR del anticuerpo puede ser una molécula distinta de proteína, en el que el anticuerpo presenta un patrón de unión similar a péptidos de activina A humana en un ensayo de unión de competición como el presentado por al menos uno de los anticuerpos A1-A14, y/o neutraliza la activina A. La parte no CDR del anticuerpo puede estar compuesta por aminoácidos, en el que el anticuerpo es una proteína de unión recombinante o un péptido sintético, y la proteína de unión recombinante bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo descrito en la presente memoria a activina A y/o neutraliza la activina A. La parte no CDR del anticuerpo puede estar compuesta por aminoácidos, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, y el anticuerpo recombinante presenta un patrón de unión similar a péptidos de activina A humana en el ensayo de unión de competición a epítipo de activina A humana (descrito más adelante en la presente memoria) que el presentado por al menos uno de los anticuerpos A1-A14, y/o neutraliza la activina A.

Cuando un anticuerpo comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 como se ha descrito anteriormente, puede obtenerse por la expresión de una célula huésped que contiene el ADN que codifica estas secuencias. Un ADN que codifica para cada secuencia de CDR puede determinarse tomando como base la secuencia de aminoácidos de la CDR y sintetizarse junto con cualquier marco de región variable de anticuerpo deseada y secuencias de ADN de región constante usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos, mutagénesis dirigida a sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado. El ADN que codifica marcos de región variable y regiones constantes está ampliamente disponible para los expertos en la técnica a partir de bases de datos de secuencias genéticas tales como GenBank®.

Una vez sintetizado, el ADN que codifica un anticuerpo de la invención o fragmento de éste puede propagarse y expresarse según cualquiera de una variedad de procedimientos muy conocidos para la escisión, ligación, transformación, y transfección de ácido nucleico usando cualquier número de vectores de expresión conocidos. Así, en determinadas realizaciones, la expresión de un fragmento de anticuerpo puede preferirse en un huésped procarionta, tal como *Escherichia coli* (véase, por ejemplo, Pluckthun et al., 1989 Methods Enzymol. 178:497-515). En otras determinadas realizaciones, la expresión del anticuerpo o un fragmento de éste puede preferirse en una célula huésped eucariota, incluyendo levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), células animales (incluyendo células de mamífero) o células de plantas. Los ejemplos de células animales adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células de mieloma (tal como una línea de ratón NSO), COS, CHO, o células de hibridoma. Los ejemplos de células de plantas incluyen células de tabaco, maíz, soja, y arroz.

Puede prepararse uno o más vectores de expresión replicables que contienen ADN que codifica una región variable y/o constante de anticuerpo y usarse para transformar una línea celular apropiada, por ejemplo, una línea celular de mieloma no productora, tal como una línea de ratón NSO o una bacteria, tal como *E. coli*, en la que se producirá la producción del anticuerpo. Con el fin de obtener una transcripción y traducción eficaces, la secuencia de ADN en cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, particularmente un promotor y una secuencia líder unidas de manera operativa con la secuencia de dominio variable. Los métodos particulares para producir anticuerpos de esta manera son muy conocidos generalmente y usados rutinariamente. Por ejemplo, se describen procedimientos básicos de biología molecular por Maniatis et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; véase también Maniatis et al., 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (2001)). La secuenciación del ADN puede realizarse como se describe en Sanger et al. (PNAS 74:5463, (1977)) y el manual de secuenciación de Amersham International plc, y la mutagénesis dirigida a sitio puede llevarse a cabo según métodos conocidos en la técnica (Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12:9441, (1984); Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92 (1985); Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154:367-82 (1987); the Anglian Biotechnology Ltd. handbook). Además, numerosas publicaciones describen técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos por manipulación de ADN, creación de vectores de expresión, y transformación y cultivo de células apropiadas (Mountain A y Adair, J R en Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (ed. Tombs, M P, 10, Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, Reino Unido); "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, Nueva York).

Cuando se desea mejorar la afinidad de anticuerpos según la invención que contienen una o más de las CDR mencionadas anteriormente puede obtenerse por varios protocolos de maduración de afinidad incluyendo mantener las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas de mutación de *E. coli*. (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996), intercambio de cadenas de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), exposición en fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Todos estos métodos de maduración de afinidad se discuten por Vaughan et al. (Nature Biotech., 16, 535-539, 1998).

Otros anticuerpos según la invención pueden obtenerse por procedimientos convencionales de inmunización y fusión celular como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de

la invención pueden generarse usando una variedad de técnicas conocidas. En general, los anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos específicos pueden obtenerse por métodos conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975; Coligan et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); Patentes U.S. Nos. RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol (eds.) (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2a Edition, Glover et al. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)). Los fragmentos de anticuerpo pueden derivar de éstos usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica, u opcionalmente, por digestión proteolítica (por ejemplo, usando papaína o pepsina) seguido de reducción suave de los enlaces disulfuro y alquilación. Alternativamente, dichos fragmentos también pueden generarse por técnicas de ingeniería genética recombinantes como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando a un animal, por ejemplo una rata, hámster, un conejo, o preferiblemente un ratón, incluyendo por ejemplo un transgénico o inactivado genéticamente, como se conoce en la técnica, un inmunógeno que comprende activina A humana de (SEQ ID NO:225), o un fragmento de ésta, según métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. La presencia de la producción de anticuerpos específicos puede monitorizarse después de la inyección inicial y/o después de una inyección de refuerzo mediante la obtención de una muestra de suero y detectando la presencia de un anticuerpo que se une a activina A humana o péptido usando uno cualquiera de los varios métodos de inmunodetección conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. De animales que producen los anticuerpos deseados, se retiran las células linfoides, más comúnmente las células del bazo o ganglio linfático, para obtener linfocitos B. Los linfocitos B se fusionan con una pareja de fusión de célula de mieloma sensibilizada a fármaco, preferiblemente una que es singénica con el animal inmunizado y que opcionalmente tiene otras propiedades deseables (por ejemplo, incapacidad de expresar productos génicos de Ig endógenos, por ejemplo P3X63 - Ag 8.653 (ATCC No. CRL 1580); NSO, SP20) para producir hibridomas, que son líneas celulares eucariotas inmortales.

Las células linfoides (por ejemplo, bazo) y las células de mieloma pueden combinarse durante unos pocos minutos con un agente que estimula la fusión de membranas, tal como polietilén glicol o un detergente no iónico, y plaquearse a baja densidad en un medio selectivo que apoya el crecimiento de las células de hibridoma pero no de las células de mieloma no fusionadas. Un medio de selección preferido es HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente aproximadamente una a dos semanas, se observan colonias de células. Se aíslan colonias únicas, y los anticuerpos producidos por las células pueden ensayarse para actividad de unión a activina A humana, usando uno cualquiera de una variedad de inmunoensayos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Los hibridomas se clonan (por ejemplo, por clonación de dilución limitada o por aislamiento de placa de agar blando) y los clones positivos que producen un anticuerpo específico para activina A se seleccionan y cultivan. Los anticuerpos monoclonales de los cultivos de hibridoma pueden aislarse de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma.

Un método alternativo para la producción de un anticuerpo monoclonal murino es inyectar las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón singénico, por ejemplo, un ratón que se ha tratado (por ejemplo, se ceban con pristano) para estimular la formación de fluido de ascites que contiene el anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse por una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)). Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía de afinidad usando un ligando apropiado seleccionado tomando como base propiedades particulares del anticuerpo (por ejemplo, isotipo de cadena pesada o ligera, especificidad de unión, etc.). Los ejemplos de un ligando adecuado, inmovilizado en un soporte sólido, incluyen Proteína A, Proteína G, un anticuerpo de región anticonstante (cadena ligera o cadena pesada), un anticuerpo anti-idiotipo, y una proteína de unión a TGF-beta, o fragmento o variante de éstos.

Un anticuerpo de la presente invención también puede ser un anticuerpo monoclonal completamente humano. Se proporciona un anticuerpo completamente humano aislado que se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, en el que la proteína de unión a antígeno posee al menos una actividad biológica *in vivo* de un anticuerpo anti-activina A humana. La actividad biológica puede ser atenuación de caquexia, por ejemplo caquexia en cáncer de colon, tal como en un modelo de ratón de cáncer de colon descrito en la presente memoria. La caquexia susceptible de dicho tratamiento está asociada con pérdida de peso corporal, pérdida de masa muscular, y/o pérdida de masa grasa. La caquexia puede estar asociada con artritis reumatoide, tal como en el modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno. El tratamiento con un anticuerpo completamente humano descrito en la presente memoria mejora la pérdida de peso corporal, pérdida de masa muscular, y/o pérdida de masa grasa *in vivo* en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno. Un anticuerpo completamente humano descrito en la presente memoria mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal transfectado con AAV-activina A. Un anticuerpo completamente humano descrito en la presente memoria, que se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vitro*. Un anticuerpo completamente

humano aislado que se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vivo*.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden generarse por cualquiera de varias técnicas que serán familiares para los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no están limitados a, transformación con el virus de Epstein Barr (EBV) de células de sangre periférica humana (por ejemplo, que contienen linfocitos B), inmunización *in vitro* de células B humanas, fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan genes de inmunoglobulina humana insertados, aislamiento de bibliotecas de fago de región V de inmunoglobulina humana, u otros procedimientos como se conocen en la técnica y basados en la descripción de la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden obtenerse de ratones transgénicos que se han preparado por ingeniería para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a un pulso antigénico. Los métodos para obtener anticuerpos completamente humanos de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994; Patente U.S. No. 5.877.397; Bruggemann et al., 1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits et al., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35. En esta técnica, se introducen elementos del locus de cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógenos (véase también Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997)). Por ejemplo, los transgenes de inmunoglobulina humana pueden ser mini-construcciones génicas, o transloci en cromosomas artificiales de levadura, que experimentan reorganización de ADN específico de células B e hipermutación en el tejido linfático de ratón. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden obtenerse inmunizando los ratones transgénicos, que pueden producir anticuerpos humanos específicos para activina A. Las células linfoides de los ratones transgénicos inmunizados pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos según los métodos descritos en la presente memoria. Los sueros policlonales que contienen anticuerpos completamente humanos también pueden obtenerse de la sangre de los animales inmunizados.

Otro método para generar anticuerpos humanos de la invención incluye immortalizar células de sangre periférica humana por transformación con EBV. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.464.456. Dicha línea celular de células B immortalizada (o línea celular linfoblastoide) que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a activina A puede identificarse por métodos de inmunodetección como se proporciona en la presente memoria, por ejemplo, un ELISA, y aislarse por técnicas estándar de clonación. La estabilidad de la línea celular linfoblastoide que produce un anticuerpo anti-activina A puede mejorarse fusionando la línea celular transformada con un mieloma murino para producir una línea celular híbrida de ratón-humana según los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Glasky et al., Hybridoma 8:377-89 (1989)). Otro método más para generar anticuerpos monoclonales humanos es inmunización *in vitro*, que incluye cebar células B esplénicas humanas con activina A humana, seguido de la fusión de las células B cebadas con una pareja de fusión heterohíbrida. Véase, por ejemplo, Boerner et al., 1991 J. Immunol. 147:86-95.

En determinadas realizaciones, una célula B que produce un anticuerpo anti-activina A humana se selecciona y las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada se clonan de la célula B según técnicas de biología molecular conocidas en la técnica (WO 92/02551; Patente U.S. 5.627.052; Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)) y descritas en la presente memoria. Las células B de un animal inmunizado pueden aislarse del bazo, ganglio linfático, o muestra de sangre periférica seleccionando una célula que está produciendo un anticuerpo que se une específicamente a activina A. Las células B también pueden aislarse de seres humanos, por ejemplo, de una muestra de sangre periférica. Los métodos para detectar células B únicas que están produciendo un anticuerpo con la especificidad deseada son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por formación de placas, separación celular activada por fluorescencia, estimulación *in vitro* seguida de detección de anticuerpo específico, y semejantes. Los métodos para seleccionar células B productoras de anticuerpos específicos incluyen, por ejemplo, preparar una suspensión de células únicas de células B en agar blando que contiene activina A humana. La unión del anticuerpo específico producido por la célula B al antígeno resulta en la formación de un complejo, que puede ser visible como un inmunoprecipitado. Después de seleccionar las células B que producen el anticuerpo deseado, los genes del anticuerpo específico pueden clonarse por aislamiento y amplificación del ADN o ARNm según métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

Un método adicional para obtener anticuerpos de la invención es por exposición en fagos. Véase, por ejemplo, Winter et al., 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton et al., 1994 Adv. Immunol. 57:191-280. Pueden crearse bibliotecas combinatorias de genes de región variable de inmunoglobulina humana o murina en vectores de fagos que pueden cribarse para seleccionar fragmentos Ig (Fab, Fv, sFv, o multímeros de éstos) que se unen específicamente a la proteína de unión a TGF-beta o variante o fragmento de ésta. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5.223.409; Huse et al., 1989 Science 246:1275-81; Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32 (1989); Altling-Mees et al., Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990); Kang et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66; Hoogenboom et al., 1992 J. Molec. Biol. 227:381-388; Schlebusch et al., 1997 Hybridoma 16:47-52 y referencias citadas en ellas. Por ejemplo, puede insertarse una biblioteca que contiene una pluralidad de secuencias de polinucleótidos que codifican fragmentos de región variable de Ig en el genoma de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o una variante de éste, en marco con la secuencia que codifica una proteína de cubierta del fago. Una proteína de fusión puede ser una fusión de la proteína de cubierta del fago con el dominio de región variable de cadena ligera y/o con el dominio de región variable de cadena pesada. Según determinadas realizaciones, también

pueden exponerse fragmentos Fab de inmunoglobulina en una partícula de fago (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5.698.426).

También pueden prepararse bibliotecas de expresión de ADNc de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina en fago lambda, por ejemplo, usando vectores λ ImmunoZapTM(H) y λ ImmunoZapTM(L) (Stratagene, La Jolla, California). Brevemente, se aísla el ARNm de una población de células B, y se usa para crear bibliotecas de expresión de ADNc de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina en los vectores λ ImmunoZap(H) y λ ImmunoZap(L). Estos vectores pueden cribarse individualmente o co-expresarse para formar fragmentos Fab o anticuerpos (véase Huse et al., supra; véase también Sastry et al., supra). Las placas positivas pueden convertirse posteriormente en un plásmido no lítico que permite un alto nivel de expresión de fragmentos de anticuerpo monoclonal de *E. coli*.

En una realización, en un hibridoma se amplifican las regiones variables de un gen que expresa un anticuerpo monoclonal de interés usando cebadores de nucleótidos. Estos cebadores pueden sintetizarse por un experto en la técnica, o pueden adquirirse de fuentes disponibles comercialmente. (Véase, por ejemplo, Stratagene (La Jolla, California), que vende cebadores para regiones variables de ratón y humanas incluyendo, entre otros, cebadores para las regiones V_{Ha}, V_{Hb}, V_{Hc}, V_{Hd}, C_{H1}, V_L y C_L). Estos cebadores pueden usarse para amplificar regiones variables de cadena pesada o ligera, que pueden insertarse en vectores tales como ImmunoZAPTMH o ImmunoZAPTML (Stratagene), respectivamente. Estos vectores pueden introducirse en *E. coli*, levadura, o sistemas basados en mamíferos para expresión. Pueden producirse grandes cantidades de una proteína de cadena única que contiene una fusión de los dominios V_H y V_L usando estos métodos (véase Bird et al., Science 242:423-426, 1988).

Una vez se han obtenido las células que producen anticuerpos según la invención usando cualquiera de las técnicas de inmunización descritas anteriormente y otras, los genes de anticuerpo específico pueden clonarse aislando y amplificando el ADN o ARNm de ellos según procedimientos estándar como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos producidos de ellos pueden secuenciarse y las CDR identificarse y el ADN que codifica las CDR puede manipularse como se ha descrito anteriormente para generar otros anticuerpos según la invención.

Los agentes de unión a activina A de la presente invención modulan preferiblemente la función de activina A en el ensayo basado en células descrito en la presente memoria y/o el ensayo *in vivo* descrito en la presente memoria y/o se unen a uno o más de los dominios de nudo de cisteína descritos en la presente memoria y/o bloquean de manera cruzada la unión de uno de los anticuerpos descritos en esta solicitud y/o bloquean de manera cruzada la unión a activina A de uno de los anticuerpos descritos en esta solicitud. De acuerdo con esto, dichos agentes de unión pueden identificarse usando los ensayos descritos en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos se generan identificando en primer lugar los anticuerpos que se unen a uno o más de los dominios de nudo de cisteína proporcionados en la presente memoria y/o neutralizan en los ensayos basados en células y/o los ensayos *in vivo* descritos en la presente memoria y/o bloquean de manera cruzada los anticuerpos descritos en esta solicitud y/o bloquean de manera cruzada la unión a activina A de uno de los anticuerpos descritos en esta solicitud. Las regiones CDR de estos anticuerpos se usan para insertar en marcos biocompatibles apropiados para generar agentes de unión de activina A. La parte no CDR del agente de unión puede estar compuesta por aminoácidos, o puede ser una molécula diferente de proteína. Los ensayos descritos en la presente memoria permiten la caracterización de agentes de unión. Preferiblemente, los agentes de unión de la presente invención son anticuerpos como se define en la presente memoria.

Un experto en la técnica entenderá que algunas proteínas, tales como anticuerpos, pueden experimentar una variedad de modificaciones posteriores a la traducción. El tipo y grado de estas modificaciones depende frecuentemente de la línea celular huésped usada para expresar la proteína así como las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperizina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995).

Ácidos nucleicos

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas. Los ácidos nucleicos comprenden, por ejemplo, polinucleótidos que codifican toda o parte de la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado, muteína, o variante de ésta, polinucleótidos suficientes para uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de lo anterior. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier longitud. Pueden tener, por ejemplo, una longitud de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500, 3.000, 5.000 o más nucleótidos, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o ser parte de un ácido nucleico mayor, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN, y variantes artificiales de éstos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada o ligera, sólo dominio variable, o longitud completa) pueden aislarse de células B de ratones que se han inmunizado con activina A. El ácido nucleico puede aislarse por procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de las regiones variables de cadena pesada y ligera se han mostrado anteriormente. El experto en la técnica apreciará que, debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias de polipéptido descritas en la presente memoria está codificada por un gran número de otras secuencias de ácido nucleico. La presente invención proporciona cada secuencia de nucleótidos degenerada que codifica cada proteína de unión a antígeno de la invención.

10 La invención proporciona además ácidos nucleicos que hibridan con otros ácidos nucleicos en condiciones particulares de hibridación. Los métodos para hibridar ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Curr. Prot. in Mol. Biol., John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Como se define en la presente memoria, una condición de hibridación moderadamente astringente usa una disolución de prelavado que contiene 5X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC), 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50% formamida, 6X SSC, y una temperatura de hibridación de 55°C (u otras disoluciones de hibridación similares, tales como una que contiene aproximadamente 50% formamida, con una temperatura de hibridación de 42°C), y condiciones de lavado de 60°C, en 0,5X SSC, 0,1% SDS. Una condición de hibridación astringente hibrida en 6X SSC a 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC, 0,2% SDS a 68°C. Además, un experto en la técnica puede manipular las condiciones de hibridación y/o lavado para incrementar o disminuir la astringencia de la hibridación de manera que los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99% idénticas entre sí típicamente permanecen hibridados entre sí. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para averiguar las condiciones adecuadas se muestran, por ejemplo, por Sambrook, Fritsch, y Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11; y Curr. Prot. in Mol. Biol. 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica tomando como base, por ejemplo, la longitud y/o la composición de bases del ADN.

30 Pueden introducirse cambios por mutación en un ácido nucleico, dando lugar de esta manera a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno) que codifica. Las mutaciones pueden introducirse usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización, uno o más residuos particulares de aminoácidos se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida a sitio. En otra realización, uno o más residuos seleccionados al azar se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis al azar. Independientemente de cómo se haga, un polipéptido mutante puede expresarse y cribarse para una propiedad deseada (por ejemplo, unión a activina A).

35 Las mutaciones pueden introducirse en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que dan lugar a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos no esenciales. En una realización, una secuencia de nucleótidos proporcionada en la presente memoria para A1-A14, o un fragmento, variante, o derivado deseado de ésta, se muta de manera que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una o más delecciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que se muestran en la presente memoria para A1-A14 que son residuos en los que se diferencian dos o más secuencias. Como se describe en la presente memoria, entre otros, A1-A14 se refiere a 14 secuencias, A1, y A14, así como los 12 residuos de aminoácidos que intervienen. En otra realización, la mutagénesis inserta un aminoácido adyacente a uno o más residuos de aminoácidos mostrados en la presente memoria para A1-A14 que son residuos en los que se diferencian dos o más secuencias. Alternativamente, pueden introducirse una o más mutaciones en un ácido nucleico que cambian selectivamente la actividad biológica (por ejemplo, unión a activina A) de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativamente o cualitativamente la actividad biológica. Los ejemplos de cambios cuantitativos incluyen incrementar, reducir o eliminar la actividad. Los ejemplos de cambios cualitativos incluyen el cambio de la especificidad de antígeno de una proteína de unión a antígeno.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico de la invención. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender sólo una parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa de la invención, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte activa (por ejemplo, una parte de unión a activina A) de un polipéptido de la invención.

Las sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico de la invención pueden usarse para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcritos que codifican un polipéptido de la invención. La sonda puede comprender un grupo marcador, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de una enzima. Dichas sondas pueden usarse para identificar una célula que expresa el polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una parte de éste. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no están limitados a, plásmidos, vectores virales, vectores de mamífero no episomales y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes.

- 5 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas tomando como base las células huésped que se van a usar para la expresión, que están unidas de manera operativa con la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped (por ejemplo, potenciador del gen temprano de SV40, promotor del virus de sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido, véase Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237), y las que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o condición particular (por ejemplo, el promotor de metalotionina en células de mamífero y el promotor de respuesta a tet y/o el promotor de respuesta a estreptomycin tanto en sistemas procariotas como eucariotas (véase *id.*). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de esta manera proteínas o péptidos, incluyendo
- 20 proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria.

- En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (por ejemplo, células CHO)). El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, sólo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras las otras células mueren), entre otros métodos.
- 25
- 30

Indicaciones

- La descripción proporciona métodos para tratar a un sujeto. El método puede tener, por ejemplo, un efecto beneficioso en la salud del sujeto, por ejemplo, puede incrementar la longevidad esperada del sujeto. Alternativamente, el método puede, por ejemplo, tratar, prevenir, curar, aliviar, o mejorar ("tratar") una enfermedad, trastorno, afección, o dolencia ("una afección"). Entre las afecciones que se van a tratar según la presente invención están afecciones caracterizadas por la expresión o actividad inapropiada de activina A. En algunas de dichas afecciones, el nivel de expresión o actividad es demasiado alto, y el tratamiento comprende administrar un antagonista de activina A como se describe en la presente memoria.
- 35
- 40

- Un ejemplo de un tipo de afección que puede tratarse usando los métodos y composiciones de la descripción es una afección que implica el crecimiento celular, por ejemplo, una afección cancerosa que está acompañada de caquexia. Así, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para tratar una afección cancerosa. En particular, la afección cancerosa es un cáncer gonadal, incluyendo tumores del ovario y testículos. (Fujii, Y. et al., Am. J. Phys. Endocrin. Metab., 286:E927-E931, 2004; Reis, F. M. et al., J. Clin. Endocrin. 87:2277-2282, 2005.) La activina A es conocida por su acción en la estimulación de la biosíntesis y secreción de FSH en la glándula pituitaria, y tiene un papel fisiológico en la regulación de la función gonadal. La activina A se ha asociado con muchos tipos de cánceres humanos y en particular con tumores del sistema reproductor. Específicamente, la sobreexpresión o desregulación de activina A se ha implicado en el cáncer de ovario, (Menon U, et al., BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology; 107(9):1069-74, 2000. Choi KC, et al., Molecular & Cellular Endocrinology. 174(1-2):99-110, 2001; Zheng W, et al., American Journal of Reproductive Immunology. 44(2):104-13, 2000; Lambert-Messerlian GM, et al., Gynecologic Oncology. 74(1):93-7, 1999; Steller MD, et al., Molecular Cancer Research: MCR. 3(1):50-61, 2005; Corbellis L., et al., Journal of the Society for Gynecologic Investigation. 11(4):203-6, 2004; Welt CK, et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 82(11):3720-7, 1997; y Harada K., et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 81(6):2125-30, 1996, adenocarcinoma endometrial Otani, T, et al., Gynecologic Oncology. 83(1):31-8, 2001; Tanaka T, et al., International Journal of Oncology. 23(3):657-63, 2003 y cáncer de próstata (Thomas TZ, et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 82(11):3851-8, 1997; Zhang, Z, et al., Biochemical & Biophysical Research Communications. 234(2):362-5, 1997; y Risbridger GP, et al., Molecular & Cellular Endocrinology. 180(1-2):149-53, 2001
- 45
- 50
- 55

- La afección cancerosa puede ser cualquier afección cancerosa que pueda tratarse usando las composiciones comprendidas en la presente memoria, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno activina A tales como anticuerpos
- 60

anti-activina A, fragmentos de anticuerpo, o derivados de anticuerpo. Los ejemplos de afecciones cancerosas incluyen por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, astrocitoma cerebelar de la infancia, astrocitoma cerebral de la infancia, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de hueso

5 osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, tumores del cerebro (por ejemplo, glioma del tronco cerebral, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la ruta visual e hipotalámico), cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma de

10 primario desconocido, sistema nervioso central primario, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer del cuello uterino, cánceres de la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, familia de ewing de tumores, tumor de célula germinal extracranenana, tumor de

15 célula germinal extragonadal, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de melanoma de ojo intraocular, cáncer de ojo retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores de célula germinal (por ejemplo, extracraniano, extragonadal, y de ovario), tumor trofoblástico gestacional, glioma (por ejemplo, de adulto, tronco cerebral de la infancia, astrocitoma cerebral de la

20 infancia, ruta visual de la infancia e hipotalámico), leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma hipotalámico y de la ruta visual, melanoma intraocular, carcinoma de células del islote (páncreas endocrino), Sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (célula renal),

25 cáncer laríngeo, leucemia (por ejemplo, linfoblástica aguda, mielóide aguda, linfocítica crónica, mielógena crónica, y célula pilosa), cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma (por ejemplo, relacionado con SIDA, de Burkitt, de célula T cutáneo, de Hodgkin, no de Hodgkin, y sistema nervioso central primario), Macroglobulinemia de Waldenström, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de

30 célula Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasma de célula plasmática, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mielóide crónica, mieloma múltiple, enfermedades mieloproliferativas crónicas, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso,

35 cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de célula germinal de ovario, tumor potencial bajo maligno de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático de las células de los islotes, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroides, cáncer del pene, feocromocitoma, pineoblastoma, tumor pituitario, neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), cáncer de células transicionales de la pelvis y

40 uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de la glándula salivar, sarcoma de tejido blando, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanoma, carcinoma de piel de célula de merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de célula escamosa, linfoma de células T cutáneo, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico gestacional, carcinoma de sitio primario desconocido, cáncer de sitio primario desconocido, cáncer uretral, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino,

de Wilms.

Se describe un oligopéptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica al menos a una de las CDR de los anticuerpos A1-A14; y/o a una CDR de un agente de

45 unión a activina A que bloquea de manera cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos A1-A14 a activina A, y/o se bloquean de manera cruzada para la unión a activina A por al menos uno de los anticuerpos A1-A14; y/o a una CDR de un agente de unión a activina A en el que el agente de unión puede bloquear la unión de activina A al receptor de activina A.

Se describen polipéptidos y anticuerpos como agentes de unión a activina A que tienen secuencias de aminoácidos que son al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idénticas a una región variable de al menos uno de los anticuerpos A1-A14, y bloquea de manera cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos A1-A14 a activina A, y/o se bloquean de manera cruzada para la unión a activina A por al menos uno de los anticuerpos A1-A14; y/o pueden bloquear el efecto inhibitor de activina A sobre un receptor de

50 activina A.

Pueden usarse anticuerpos terapéuticos que se unen específicamente a activina A intacta, en los que las secuencias en la región de aproximadamente C11-S33 (primer bucle) y aproximadamente C81-E111 (segundo bucle) retienen la conformación de la activina A nativa. Dicho mapeo y unión se describe en el Ejemplo 6, más adelante.

55

Los anticuerpos pueden tener una afinidad de unión para activina A humana de menos de o igual a 1×10^{-7} M, menos de o igual a 1×10^{-8} M, menos de o igual a 1×10^{-9} M, menos de o igual a 1×10^{-10} M, menos de o igual a 1×10^{-11} M, o

60 menos de o igual a 1×10^{-12} M.

La afinidad de un anticuerpo o pareja de unión, así como el grado en el que un anticuerpo inhibe la unión, puede determinarse por un experto en la técnica usando técnicas convencionales, por ejemplo las descritas por Scatchard

et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) o por resonancia de plasmón superficial (SPR; BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ). Para la resonancia de plasmón superficial, las moléculas diana se inmovilizan en una fase sólida y se exponen a ligandos en una fase móvil que corre a lo largo de una celda de flujo. Si se produce la unión del ligando a la diana inmovilizada, el índice refractario cambia, dando lugar a un cambio en el ángulo SPR, que puede monitorizarse en tiempo real detectando cambios en la intensidad de la luz reflejada. Las proporciones de cambio de la señal SPR pueden analizarse para rendir constantes de proporción aparentes para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La velocidad de estos valores proporciona la constante de equilibrio aparente (afinidad) (véase, por ejemplo, Wolff et al., Cancer Res. 53:2560-65 (1993)).

Un anticuerpo según la presente invención puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, o IgA. Puede obtenerse de o derivar de un animal, por ejemplo, ave de corral (por ejemplo, pollo) y mamíferos, que incluye pero no está limitado a un ratón, rata, hámster, conejo, u otro roedor, vaca, caballo, oveja, cabra, camello, ser humano, u otro primate. El anticuerpo puede ser un anticuerpo internalizante. La producción de anticuerpos se describe generalmente en la Publicación de Patente U.S. No. 2004/0146888 A1.

Ensayos de Caracterización

En los métodos descritos anteriormente para generar anticuerpos según la invención, incluyendo la manipulación de las CDR específicas de A1-A14 en nuevos marcos y/o regiones constantes, están disponibles ensayos apropiados para seleccionar los anticuerpos deseados (es decir, ensayos para determinar la afinidad de unión a activina A; ensayos de bloqueo cruzado; ensayo de competición de unión basado en BIAcore;" ensayos *in vivo*).

Métodos terapéuticos y administración de proteínas de unión a antígeno

Determinados métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar una proteína de unión a antígeno que se une a activina A a un sujeto, mediante lo cual se reduce una respuesta biológica inducida por activina A que juega un papel en una afección particular. En particular, los métodos como se describe implican poner en contacto activina A endógena con una proteína de unión a antígeno que se une a activina A, por ejemplo, mediante la administración a un sujeto o en un procedimiento *ex vivo*.

El término "tratamiento" engloba el alivio o prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, o reducción de la gravedad de la enfermedad, y semejantes. Además, "tratamiento" se refiere además a administrar un agente terapéutico como se describe en la presente memoria para prevenir o aliviar al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno en un sujeto que lo necesita. Una proteína de unión a antígeno no necesita efectuar una cura completa, o erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado patológico dado, pero no necesitan suprimir cada manifestación de la enfermedad para ser considerados como agentes terapéuticos útiles. De forma similar, un tratamiento administrado profilácticamente no necesita ser completamente eficaz en la prevención del inicio de una afección con el fin de constituir un agente profiláctico viable. Es suficiente con reducir simplemente el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reducir el número o gravedad de sus síntomas, o incrementar la eficacia de otro tratamiento, o producir otro efecto beneficioso), o reducir la probabilidad de que la enfermedad ocurrirá o empeorará en un sujeto. Una realización de la invención está dirigida a un método que comprende administrar a un paciente un antagonista de activina A en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida sobre la línea base de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Como se entiende en el campo pertinente, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención se administran a un sujeto que lo necesita de una manera apropiada para la indicación. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier técnica adecuada, incluyendo pero no limitado a parenteralmente, tópicamente, o por inhalación. Si se inyectan, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, por ejemplo, mediante rutas intra-articular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, por inyección en bolo, o infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o lesión, al igual que la administración transdérmica y liberación sostenida de implantes. La administración por inhalación incluye, por ejemplo, inhalación nasal u oral, uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol, y semejantes. Otras alternativas incluyen gotas oculares; preparaciones orales incluyendo píldoras, jarabes, pastillas o chicle; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores, y pomadas.

Se describe el uso de proteínas de unión a antígeno en procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, la sangre de un paciente u otro fluido corporal puede ponerse en contacto con una proteína de unión a antígeno que se une a activina A de longitud completa, una o más isoformas de activina A, u otra activina A con longitud parcial *ex vivo*. La proteína de unión a antígeno puede unirse a una matriz insoluble o material de soporte sólido adecuados.

Ventajosamente, las proteínas de unión a antígeno se administran en la forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales tales como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende además uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo, una segunda sustancia inhibidora del receptor de activina A, una sustancia anti-angiogénica, una sustancia

quimioterapéutica, una sustancia analgésica, etc., los ejemplos non-exclusivos de las cuales se proporcionan en la presente memoria. En varias realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis agentes fisiológicamente activos además de una proteína de unión a antígeno que se une a activina A.

- 5 En una realización la composición farmacéutica comprende una proteína de unión a antígeno de la invención junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como los que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizador, y un excipiente. La disolución salina tamponada neutra o disolución salina mezclada con albúmina de son ejemplos de diluyentes apropiados. Según estándares industriales apropiados, también pueden
- 10 añadirse conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede formularse como un liofilizado usando disoluciones de excipiente apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los ejemplos adicionales de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a Ed. (1980) y 20a Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.
- 15 Los kits para uso por los médicos incluyen una proteína de unión a antígeno de la invención y una etiqueta u otras instrucciones para uso en el tratamiento de cualquiera de las afecciones discutidas en la presente memoria. En una realización, el kit incluye una preparación estéril de una o más proteínas de unión a antígeno, que pueden estar en la forma de una composición como se ha descrito anteriormente, y puede estar en uno o más viales.

- 20 Las dosificaciones y la frecuencia de administración puede variar según factores tales como la ruta de administración, las proteínas de unión a antígeno particulares empleadas, la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se va a tratar, si la afección es aguda o crónica, y el tamaño y condición general del sujeto. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, en estudios clínicos que pueden implicar estudios de escalada de la dosis.

- 25 Una proteína de unión a antígeno de la invención puede administrarse, por ejemplo, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares durante un periodo de tiempo. En realizaciones particulares, una proteína de unión a antígeno se administra durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos, o tres meses o incluso indefinidamente. Para el tratamiento de afecciones crónicas, lo más eficaz generalmente es el tratamiento a largo plazo. Sin embargo, para el tratamiento de afecciones agudas, puede ser suficiente la administración durante periodos más cortos, por ejemplo, de una a seis semanas. En general, la proteína de unión a antígeno se administra
- 30 hasta que el paciente manifiesta un grado médicamente relevante de mejoría sobre la línea base para el indicador o indicadores elegidos.

- Las realizaciones particulares de la presente invención implican administrar una proteína de unión a antígeno a una dosificación de aproximadamente 1 ng de proteína de unión a antígeno por kg del peso del sujeto al día ("1 ng/kg/día") a aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 500 ng/kg/día a
- 35 aproximadamente 5 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 µg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. En realizaciones adicionales, una proteína de unión a antígeno se administra a adultos una vez por semana, dos veces por semana, o tres o más veces por semana, para tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por activina A, por ejemplo, un trastorno médico descrito en la presente memoria. Si se inyecta, la cantidad eficaz de proteína de unión a antígeno por dosis en adultos puede variar de 1-20 mg/m², y preferiblemente es aproximadamente 5-12 mg/m². Alternativamente, puede administrarse una dosis plana; la cantidad puede variar de 5-100 mg/dosis. Un intervalo para una dosis plana es aproximadamente 20-30 mg por dosis. En una realización de la invención, una dosis plana de 25 mg/dosis se administra repetidamente por inyección. Si se usa una ruta de administración distinta de inyección, la dosis se ajusta apropiadamente según prácticas médicas estándar. Un
- 40 ejemplo de un régimen terapéutico implica inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de proteína de unión a antígeno una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado deseado de mejoría. Para sujetos pediátricos (edad 4-17), un régimen adecuado ejemplar implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de proteína de unión a antígeno administrada dos o tres veces por semana.
- 45

- 50 Las realizaciones particulares de los métodos proporcionados en la presente memoria implican la inyección subcutánea de 0,5 mg a 10 mg, preferiblemente de 3 a 5 mg, de una proteína de unión a antígeno, una o dos veces por semana. Otra realización está dirigida a la administración pulmonar (por ejemplo, por nebulizador) de 3 o más mg de proteína de unión a antígeno una vez por semana.

- Los ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en la presente memoria comprenden la inyección subcutánea de una proteína de unión a antígeno una vez por semana, a una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar una
- 55 afección en la que la señalización de activina A juega un papel. Los ejemplos de dichas afecciones se proporcionan en la presente memoria e incluyen, por ejemplo, caquexia, cáncer, artritis reumatoide, y todas las afecciones en las que juega un papel la pérdida de peso corporal, masa corporal, grasa corporal, o incapacidad para mantener el peso corporal, masa corporal, grasa corporal. La administración semanal de proteína de unión a antígeno se continúa hasta que se consigue un resultado deseado, por ejemplo, la supresión de los síntomas en el sujeto. El tratamiento puede reanudarse según se necesite, o, alternativamente, pueden administrarse dosis de mantenimiento.
- 60

Otros ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en la presente memoria comprenden la administración subcutánea o intravenosa de una dosis de 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, ó 20 miligramos de un inhibidor de activina A de la presente invención por kilogramo de masa corporal del sujeto (mg/kg). La dosis puede administrarse una vez al sujeto, o más de una vez a un intervalo determinado, por ejemplo, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, o una vez al año. La duración del tratamiento, y cualesquiera cambios en la dosis y/o frecuencia de tratamiento, pueden alterarse o variarse durante el curso del tratamiento con el fin de cumplir con las necesidades particulares del sujeto.

En otra realización, una proteína de unión a antígeno se administra al sujeto en una cantidad y durante un tiempo suficiente como para inducir una mejoría, preferiblemente una mejoría sostenida, en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno que se está tratando. Varios indicadores que reflejan el grado de la dolencia, enfermedad o afección del sujeto pueden evaluarse para determinar si es suficiente la cantidad y tiempo del tratamiento. Dichos indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de gravedad de la enfermedad, síntomas, o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización, se considera que una mejoría es sostenida si el sujeto presenta una mejoría en al menos dos ocasiones separadas por dos a cuatro semanas. El grado de mejoría lo determina generalmente un médico, que puede hacer esta determinación tomando como base los signos, síntomas, biopsias, u otros resultados de ensayos, y que también puede emplear cuestionarios que se administran al sujeto, tales como cuestionarios sobre calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

Los niveles de activina A de un sujeto pueden monitorizarse antes, durante y/o después del tratamiento con una proteína de unión a antígeno, para detectar cambios, si existen, en sus niveles. Para algunos trastornos, la incidencia de niveles elevados de activina A puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad o la forma particular de la enfermedad. Pueden emplearse técnicas conocidas para medir los niveles de activina A, por ejemplo, en el suero de un sujeto. Los niveles de activina A en muestras de sangre pueden medirse usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, ELISA.

Las realizaciones particulares de métodos y composiciones de la invención implican el uso de una proteína de unión a antígeno y uno o más antagonistas adicionales de activina A, por ejemplo, dos o más proteínas de unión a antígeno de la invención, o una proteína de unión a antígeno de la invención y uno o más antagonistas diferentes de activina A. En realizaciones adicionales, las proteínas de unión a antígeno se administran solas o en combinación con otros agentes útiles para tratar la afección que padece el sujeto. Los ejemplos de dichos agentes incluyen fármacos tanto proteináceos como no proteináceos. Cuando se co-administran múltiples terapéuticos, las dosificaciones pueden ajustarse de acuerdo con esto, como se reconoce en la técnica pertinente. "Co-administración" y terapia de combinación no están limitados a la administración simultánea, sino que también incluye regímenes de tratamiento en los que una proteína de unión a antígeno se administra al menos una vez durante un curso de tratamiento que implica administrar al menos un agente terapéutico diferente al paciente.

Los ejemplos de otros agentes que pueden co-administrarse con una proteína de unión a antígeno son otras proteínas de unión a antígeno o polipéptidos terapéuticos que se eligen según la afección particular que se va a tratar. Alternativamente, los fármacos no proteináceos que son útiles para tratar una de las afecciones particulares discutidas anteriormente pueden co-administrarse con un antagonista de activina A.

Terapia de combinación

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar un sujeto con una proteína de unión a antígeno que inhibe la activina A y uno o más tratamientos diferentes. Dicha terapia de combinación consigue sinergia o un efecto aditivo, por ejemplo, atacando múltiples sitios o dianas moleculares en un tumor. Los tipos de terapias de combinación que pueden usarse en conexión con la presente invención incluyen inhibir o activar (según sea apropiado) múltiples nodos en una única ruta relacionada con la enfermedad, múltiples rutas en una célula diana, y múltiples tipos celulares en un tejido diana (por ejemplo, en un tumor). Por ejemplo, un inhibidor de activina A de la presente invención puede combinarse con un tratamiento que estimula la apoptosis o inhibe la angiogénesis. En otra realización, un agente dirigido, que, cuando se usa por sí mismo, no incita un efecto terapéutico deseado, podría usarse, por ejemplo, para sensibilizar las células cancerosas o aumentar el efecto del tratamiento de otros agentes. Un inhibidor de activina A según la invención se usa en combinación con un fármaco citotóxico u otro agente dirigido que induce apoptosis. O un inhibidor de activina A se usa en combinación con uno o más agentes que inhiben diferentes dianas que están implicadas en la supervivencia celular (por ejemplo, PKB, mTOR), diferentes tirosina quinasas de receptor (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, c-Met, c-kit), o diferentes tipos celulares (por ejemplo, inhibidores KDR, c-fms). O un inhibidor de activina A de la invención se añade a la atención médica estándar existente para una afección particular. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, gemcitabina, taxol, taxotere, y CPT-11.

Además, el método descrito comprende administrar uno o más antagonistas de activina A descritos en la presente memoria y uno o más tratamientos diferentes (por ejemplo, un tratamiento terapéutico o paliativo), por ejemplo, tratamientos anti-cáncer (tales como cirugía, ultrasonidos, radioterapia, quimioterapia, o tratamiento con otro agente anti-cáncer). Cuando un método comprende administrar más de un tratamiento a un sujeto, debe entenderse que el

orden, momento en el tiempo, número, concentración, y volumen de las administraciones está limitado sólo por los requerimientos médicos y limitaciones del tratamiento, es decir, dos tratamientos pueden administrarse al sujeto, por ejemplo, simultáneamente, consecutivamente, alternamente, o según cualquier otro régimen. Los ejemplos de agentes que pueden administrarse en combinación con los antagonistas de activina A descritos en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, agentes de refuerzo de neutrófilos, irinotecán, SN-38, gemcitabina, herstatina, o un derivado de herstatina de unión a activina A (como se describe, por ejemplo, en Solic. Pat. U.S. No. 05/0272637), AVASTIN® (Genentech, San Francisco Sur, CA), HERCEPTIN® (Genentech), RITUXAN® (Genentech), ARIMIDEX® (AstraZeneca, Wilmington, DE), IRESSA® (AstraZeneca), BEXXAR® (Corixa, Seattle, WA), ZEVALIN® (Biogen Idec, Cambridge, MA), ERBITUX® (Imclone Systems Inc., Nueva York, NY), GEMZAR® (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), CAMPTOSAR® (Pfizer, Nueva York, NY), GLEEVEC® (Novartis), SU-11248 (Pfizer), BMS-354825 (Bristol-Myers Squibb), panitumumab (Abgenix, Fremont, CA/Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), y denosumab (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

El desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración subcutánea, oral, parenteral, intravenosa, intranasal, e intramuscular y formulación, es muy conocido en la técnica, algunos de los cuales se discuten brevemente más adelante para propósitos generales de ilustración.

En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse mediante administración oral a un animal. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con vehículo comestible asimilable, o pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria subcutáneamente, parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, o incluso intraperitonealmente. Dichas estrategias son muy conocidas para el experto en la técnica, algunas de las cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5.543.158; Patente U.S. No. 5.641.515 y Patente U.S. No. 5.399.363. En determinadas realizaciones, pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de éstos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contendrán generalmente un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables (por ejemplo, véase la Patente U.S. No. 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en el que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y semejantes), mezclas adecuadas de éstos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y/o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede facilitarse mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo usando en las composiciones agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para administración parenteral en una disolución acuosa, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido hacerse en primer lugar isotónico con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1.000 ml de fluido hipodermoclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15a ed., p. 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones cumplirán, por supuesto, preferiblemente con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, y los estándares de seguridad y pureza generales según requieren los estándares de FDA Office of Biologics.

En otra realización de la invención, las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y semejantes. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y semejantes. Después de la formulación, las disoluciones se

administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que es terapéuticamente eficaz.

Los vehículos pueden comprender además cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, disoluciones vehiculares, suspensiones, coloides, y semejantes. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o similar inapropiada se administran a un ser humano.

En determinadas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas de lípido, vesículas, y semejantes, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped/organismos adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para administración bien encapsuladas en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o una nanopartícula o semejantes. Alternativamente, las composiciones de la presente invención pueden unirse, bien covalentemente o no covalentemente, a la superficie de dichos vehículos transportadores.

La formación y uso de liposomas y preparaciones semejantes a liposomas como potenciales vehículos de fármaco se conoce generalmente por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Lasic, Trends Biotechnol. 16(7):307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3):691-95, 1998; Chandran et al., Indian J. Exp. Biol. 35(8):801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3):233-61, 1995; Patente U.S. No. 5.567.434; Patente U.S. No. 5.552.157; Patente U.S. No. 5.565.213; Patente U.S. No. 5.738.868 y Patente U.S. No. 5.795.587). El uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunes o toxicidad inaceptable después de administración sistémica. En determinadas realizaciones, los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)).

Alternativamente, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones en nanocápsula farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una forma estable y reproducible (véase, por ejemplo, Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12):1113-28, 1998). Para evitar los efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1µm) pueden diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Dichas partículas pueden prepararse como se describe, por ejemplo, por Couvreur et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5(1):1-20, 1988; zur Muhlen et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 45(2):149-55, 1998; Zambaux et al., J. Controlled Release 50(1-3):31-40, 1998; y Patente U.S. No. 5.145.684.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ponerse en contenedores, junto con material de envasado que proporciona instrucciones respecto al uso de dichas composiciones farmacéuticas. Generalmente, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describe la concentración de reactivo, así como en determinadas realizaciones, las cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (por ejemplo, agua, disolución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

La dosis administrada puede variar de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal. Como será evidente para un experto en la técnica, la cantidad y frecuencia de la administración dependerá, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, la condición del paciente, etcétera. Típicamente, las composiciones pueden administrarse por una variedad de técnicas, como se ha indicado anteriormente.

La descripción también proporciona un kit de diagnóstico que comprende al menos un agente de unión anti-activina A según la presente invención. El agente de unión puede ser un anticuerpo. Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de lo siguiente:

(1) instrucciones para usar el uno o más agente(s) de unión para cribar, diagnosticar, pronosticar, monitorizar terapéuticamente o cualquier combinación de estas aplicaciones;

(2) una pareja de unión marcada del o de los agentes de unión anti-activina A;

(3) una fase sólida (tal como una tira reactiva) sobre la que se inmoviliza el o los agentes de unión anti-activina A; y

(4) una etiqueta o prospecto que indica la aprobación reguladora para el cribado, diagnóstico, pronóstico o uso terapéutico o cualquier combinación de éstos.

Si no se proporciona ninguna pareja de unión marcada del o de los agentes de unión, el agente o los agentes de unión en sí mismos pueden marcarse con uno o más marcadores detectables, por ejemplo, un resto quimioluminiscente, enzimático, fluorescente, o radioactivo.

Los ejemplos siguientes se ofrecen como ilustración, y no como limitación. Los ejemplos que no se encuentran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan como ejemplos comparativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE ACTIVINA A

Ultra filtración y diafiltración (UF/DF) de medio condicionado. R-HuActivinaA se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO). Se desarrollaron una serie de etapas para generar un material activo purificado. El proceso de purificación empezó con la concentración (diafiltración) del medio condicionado (C.M.) entre 15 a 20 veces usando un cartucho en espiral Amicon S10Y10. El medio se sometió a intercambio de tampón (diafiltró) usando 5 volúmenes de 10mM tampón tris Ph 7,0, se filtró y se almacenó.

Cromatografía de Intercambio Catiónico. La r-HuActivina A se aplicó a 5 ml/minuto a 4-80C a una columna 2,6 X 7 cm (Pharmacia) S-Sefarosa Fast Flow equilibrada en 10 mM tampón Tris Ph 7,0. La columna se lavó con el tampón de equilibrado. La r-HuActivina A se eluyó de la columna con un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio hasta 0,4M durante 20 volúmenes de columna tamponado con 10Mm Tris Ph 7,0. Las fracciones apropiadas se combinaron y se almacenaron a 4-80C.

Cromatografía en Fase Reversa HPLC C4. El pH del combinado de la columna de S-Sefarosa se ajustó a 2,0 con ácido trifluoroacético (TFA). El combinado se aplicó a una columna 1 X 25 cm Vydac C4 a temperatura ambiente equilibrada con 75% tampón A (0,1 % TFA en agua), y 25% tampón B (90% acetonitrilo, 0,1% TFA, 9,9% agua). La columna se lavó con el tampón de equilibrado. La R-HuActivina A se eluyó con un gradiente de 25% tampón B a 50% tampón B durante 50 minutos a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las fracciones apropiadas se combinaron, y se liofilizaron.

Cromatografía de Intercambio Catiónico de Alta Resolución. Una columna de 5ml S Sefarosa de Alta Resolución se equilibró con 8M urea, 10 mM fosfato de sodio, Ph 7,0 (tampón A) a temperatura ambiente. El combinado C4 liofilizado se resuspendió en tampón A y se aplicó a 5 ml/minuto, y se lavó con tampón A. La r-HuActivina A se eluyó de la columna con un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio hasta 0,15M durante 30 volúmenes de columna tamponado con 8M urea, 10Mm fosfato de sodio pH 7,0. Las fracciones apropiadas se combinaron y se almacenaron a 4-80°C.

Cromatografía en Fase Reversa HPLC C4. El pH del combinado de la columna de S-Sefarosa se ajustó a 2,0 con ácido trifluoroacético (TFA). El combinado se aplicó a una columna 1 X 25 cm Vydac C4 a temperatura ambiente equilibrada con 75% tampón A (0,1 % TFA en agua), y 25% tampón B (90% acetonitrilo, 0,1% TFA, 9,9% agua). La columna se lavó extensamente para eliminar la urea y las sales con el tampón de equilibrado. La R-HuActivina A se eluyó con un gradiente de 25% tampón B a 50% tampón B durante 50 minutos a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las fracciones apropiadas se combinaron, y la r-HuActivina A final purificada se liofilizó y se almacenó en alícuotas -80°C. SEQ ID NO:225 proporciona la secuencia de aminoácidos para activina A.

35 Ejemplo 2

GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS ANTI-ACTIVINA A

Se produjeron anticuerpos frente a activina A en ratones XenoMouse® (Abgenix, Fremont, Calif.), que son ratones que contienen genes de inmunoglobulina humana. Se usó la cepa XenoMouse® XMG2 se usó para producir anticuerpos IgG2 Kappa completamente humanos. Se usó una segunda cepa para producir anticuerpos IgG4 Kappa completamente humanos. Los ratones se inmunizaron con activina A.

Se inyectó a los ratones el antígeno (activina A) según protocolos estándar (US 2005/0118643; WO 2005/694879) en las almohadillas de las patas posteriores (5 µg por almohadilla de la pata). Las inyecciones iniciales contenían el adyuvante TiterMax® Gold (Sigma, Cat # T2684). En inyecciones posteriores, se inyectó a cada ratón un total de 5 µg de antígeno en el adyuvante gel alum (adyuvante de gel de fosfato de aluminio; Superfos Biosector a/s, distribuido por E. M. Sargent Pulp and Chemical Co., Clifton N.J., cat # 1452-250). La inyección final contenía un total de 10 µg de antígeno por ratón y no contenía un adyuvante.

Cada ratón se sangró dos días después de la sexta inyección. Las muestras de sangre de estos sangrados se ensayaron por ELISA para determinar la titulación de anticuerpos frente a activina A. Cuatro días después de la inyección final, los ratones se sacrificaron y sus ganglios linfáticos drenantes se recogieron y se recuperaron los linfocitos. Los linfocitos de los ratones de cada uno de los tres grupos se combinaron separadamente. Para enriquecer las muestras de linfocitos en células B, se deplecionaron las células T añadiendo lechos magnéticos anti-CD90 (Miltenyi Biotec cat. #491-01) y pasando los linfocitos a través de una columna LS⁺ (Miltenyi Biotec cat. # 424-01).

Cada una de las muestras de linfocitos enriquecidos en células B se fusionó con células de mieloma P3 usando un dispositivo de fusión electrocell (Genetronic, Inc., Modelo ECM 2001) para crear hibridomas. Los tres grupos de líneas de hibridoma fusionados se plaquearon en placas de 96 pocillos con medio de hibridoma como se describe (WO 2005/094879) aunque pueden usarse otros medios adecuados conocidos en la técnica. Las líneas de hibridoma se cultivaron durante 14 días a 37°C, en 15% CO₂.

Después de 14 días, los sobrenadantes de los cultivos se ensayaron por ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgG humanos frente a activina A. Los sobrenadantes de los cultivos que se ensayaron como positivos en ese ELISA se ensayaron para la presencia de la cadena kappa humana en un segundo ELISA. En ese segundo ELISA, las condiciones fueron idénticas a las del primer ELISA, excepto que el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra anti-cadena kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano. Los hibridomas que se ensayaron como positivos en ambos ensayos ELISA se expandieron adicionalmente para producir 5 ml de sobrenadante para ensayo posterior.

Un total de 160 muestras de hibridoma anti-activina A derivadas de los xeno ratones se cribaron usando un ensayo funcional basado en células y análisis de unión BIAcore como se describe en los Ejemplos más adelante. Veintitrés hibridomas se caracterizaron adicionalmente para sus propiedades respecto a la expresión, purificación, ensayo basado en células, análisis de unión, análisis de secuencia, MS, y SEC. De éstos, se identificaron tres Mabs potentes, A1, A2, y A3, para ensayo adicional como se describe más adelante. Las secuencias de aminoácidos para estos anticuerpos son como sigue: A1: SEQ ID NO:9 (variable cadena ligera); SEQ ID NO:84 (constante cadena ligera); SEQ ID NO:10 (variable cadena pesada); y SEQ ID NO:214 (constante cadena pesada). A2: SEQ ID NO:25 (variable cadena ligera); SEQ ID NO:100 (constante cadena ligera); SEQ ID NO:26 (variable cadena pesada); y SEQ ID NO:215 (constante cadena pesada). A3: SEQ ID NO:41 (variable cadena ligera); SEQ ID NO:108 (constante cadena ligera); SEQ ID NO:42 (variable cadena pesada); y SEQ ID NO:221 (constante cadena pesada).

Ejemplo 3

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HUACTIVINA A HUMANOS EN CÉLULAS CHO

Las células CS-9 usadas para transfección de los plásmidos de expresión de anti-huActivina A eran una línea celular CHO en suspensión sin suero. El clon CS-9 se seleccionó como la línea celular huésped para la expresión de proteínas recombinantes y se depositaron en medio sin suero. El depósito se ensayó para agentes adventicios y esterilidad y se encontró que no tenía agentes virales, micoplasma y microbianos.

Las líneas celulares que expresan anti-hu Activina A se aumentaron de escala usando un proceso discontinuo típico. Las células se inocularon en un biorreactor Wave después de la expansión. El cultivo se alimentó tres veces en aproximadamente el día 3, día 5 y día 9 con alimentaciones en bolo y se recogieron el día 11. Las células se centrifugaron y el medio condicionado se filtró a través de un pre filtro de diez pulgadas 0,45/0,2 micrómetros, seguido de una filtración a través de un filtro seis pulgadas 0,2 micrómetros.

Purificación de Mab del medio condicionado (C.M.) de hibridoma:

A entre 7 a 10 ml de C.M. se añadieron 100 µl de una suspensión de sólidos 1:2 de resina Mab Select equilibrada en PBS. Los tubos se pusieron en rotadores a 4-8°C toda la noche. Los tubos se centrifugaron a 1.000 X g durante 5 minutos y la fracción no unida se descartó. La resina se lavó con 5ml de PBS, y se centrifugó y se decantó como anteriormente. La resina se transfirió a un tubo de 2 ml SPIN-X, 0,45µm. La resina se lavó adicionalmente dos veces con 0,5ml de PBS, y se centrifugó. Los Mab se eluyeron con 0,2ml de 0,1M ácido acético incubando a temperatura ambiente con mezclado ocasional durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron, y se añadieron al eluato 30ul de 1M tampón Tris Ph 8,0. Los Mab purificados se almacenaron a 4-8°C.

Ejemplo 4

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE ACTIVINA BASADO EN CÉLULAS C2C12

Este ensayo demuestra la capacidad neutralizante de activina A del anticuerpo que se está ensayando midiendo el grado de inhibición de unión de activina A a su receptor. Se generó una línea celular informadora que responde a activina por transfección de células de mioblasto C2C12 (ATCC No: CRL-1772) con una construcción pMARE-luc. La construcción pMARE-luc se preparó clonando doce repeticiones de la secuencia CAGA, que representan los elementos de respuesta a activina (Dennler et al. EMBO 17: 3091-3100 (1998)) en un vector informador pLuc-MCS (Stratagene cat # 219087) antes del extremo 5' de la caja TATA. Las células de mioblasto C2C12 expresan de forma natural los receptores de activina IIB (actRIIB) en la superficie celular. Cuando la activina se une a los receptores celulares, se activa la ruta Smad, y Smad fosforilado se une al elemento de respuesta (Macias-Silva et al. Cell 87:1215 (1996)), lo que resulta en la expresión del gen de la luciferasa. La actividad luciferasa se mide usando un kit de ensayo informador de luciferasa comercial (cat # E4550, Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante.

Una línea estable de células C2C12 que se había transfectado con pMARE-luc (C2C12/pMARE clon #44) se usó para medir la actividad activina según el procedimiento siguiente.

Se plaquearon números iguales de las células informadoras (C2C12/pMARE clon #44) en cultivos de 96 pocillos. Se realizó un primer ciclo de cribado usando dos diluciones de medio condicionado que contiene anticuerpos con la concentración de activina A fijada a 4 nM. La activina A madura recombinante se pre-incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con medio condicionado a 2 x y 5 x diluciones respectivamente. El cultivo de células informadoras se trató con activina con o sin anticuerpos durante seis horas. La actividad de activina A se midió determinando la actividad luciferasa en los cultivos tratados. Este ensayo se usó para identificar inicialmente los anticuerpos que inhibían la actividad de señalización de activina A en el ensayo informador. Posteriormente, se generó una curva de titulación de nueve puntos con la concentración de activina A fijada a 4 nM. La activina A se preincubó con cada una de las nueve concentraciones siguientes de anticuerpos purificados: 0,004 nM, 0,04 nM, 0,4 nM, 4 nM, 20 nM, 40 nM, 200 nM, 400 nM y 2 μ M durante una hora antes de añadir la mezcla al cultivo celular informador. Los valores de CI_{50} para un número de anticuerpos A1, A2 y A3 se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3

MAb	CI_{50} de Células (nM)
A1	< 3
A2	< 3
A3	< 3

Ejemplo 5

ENSAYO BIACORE®

Se realizó un análisis de afinidad de los anticuerpos activina A A1, A2 y A3 en un aparato BIAcore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ), usando un chip sensor CM5, y 0,005 por ciento de tensioactivo P20 (Biacore, Inc.) como tampón de corrida. La proteína activina A madura recombinante se inmovilizó en un chip sensor CM5 de grado investigación (Biacore, Inc.) mediante grupos amina primarios usando el Kit de Acoplamiento de Amina (Biacore, Inc.) según el protocolo sugerido por el fabricante.

Se usaron ensayos de unión directa para cribar anticuerpos para su capacidad de unirse a activina A inmovilizada. Los ensayos de unión se llevaron a cabo por inyección de dos concentraciones (40 y 400 nM) de cada anticuerpo candidato en la superficie de activina A inmovilizada a una velocidad de flujo de 50 μ l/min durante 3 minutos. Después de un tiempo de disociación de 3 minutos, la superficie se regeneró. Las curvas de unión se compararon cualitativamente para intensidad de señal de unión, así como para velocidades de disociación. Los parámetros cinéticos de unión de anticuerpo que incluyeron k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y KD (constante de disociación en equilibrio) se determinaron usando el programa informático de evaluación BIA 3.1 (Biacore, Inc.). Cuanto menores son las constantes de disociación en equilibrio (expresadas en nM), mayor es la afinidad del anticuerpo para activina A.

Ejemplo 6

MAPEO DE LA REGIÓN DE UNIÓN A ACTIVINA A PARA ANTICUERPOS MONOCLONALES

Las regiones de unión del anticuerpo en la activina A se determinaron usando múltiples métodos bioquímicos, incluyendo transferencia western en condiciones reductoras o no reductoras, digestión limitada con proteasa usando LysC, análisis peptídico por MS, y competición peptídica usando BIAcore.

Los nudos de cys son características estructurales clave para los miembros de la familia TGF- β . La rotura de S-S con un agente reductor deterioró la estructura de la activina A y disminuyó la unión de activina A a anticuerpos neutralizantes, incluyendo A-1. Estos datos demuestran que los nudos de cys son importantes para la unión de activina A con estos anticuerpos neutralizantes que se unen específicamente a activina A comparado con activina B. Los nudos de cys hacen que dos bucles distantes de secuencias sean estructuralmente adyacentes entre sí. Estas dos regiones son una secuencia en la región de aproximadamente C11-S33 (primer bucle) y aproximadamente C81-E111 (segundo bucle) de activina A (Figura 7). Una digestión limitada con LysC reveló que estas dos regiones estaban protegidas por el anticuerpo A-1, lo que indica que interaccionan con los anticuerpos neutralizantes directamente. Los anticuerpos neutralizantes son sensibles a cambios conformacionales de la activina A, lo que sugiere que se unen a epítopos no lineales del antígeno. Un análisis peptídico adicional indicó que los fragmentos G-1 a K7 y S57-F74 en la activina A no se requieren para su unión con los anticuerpos neutralizantes directamente. Una comparación de la secuencia de la activina A comparada con la activina B muestra que algunas de las diferencias en la secuencia ocurren en esta región.

Ejemplo 7**ENSAYOS DE SELECTIVIDAD**

Estos ensayos se realizaron usando tecnología BIAcore®, para determinar la selectividad de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3 a varias activinas y otros miembros de la familia TGF- β , incluyendo activina A, activina B, activina AB, inhibina A, GDF-8, GDF-11, TGF- β -1, TGF- β -3, y BMP4 (todos de R & D Systems). ActRIIB/Fc se acopló covalentemente a chips sensores grado investigación según el protocolo sugerido por el fabricante. Como los ensayos BIAcore detectan cambios en el índice de refracción, la diferencia entre la respuesta detectada con inyección sobre las superficies de receptor inmovilizado comparado con la respuesta detectada con inyección sobre la superficie control en ausencia de ningún anticuerpo representa la unión real de los distintos ligandos al receptor. Con pre-incubación de anticuerpos y moléculas de activina y TGF- β , un cambio (incremento o disminución) en la respuesta de unión indica unión del anticuerpo a la familia TGF β de moléculas. Todos los anticuerpos se unieron a activina A pero no a activina B, GDF-8, GDF-11, TGF- β -1, TGF- β -3, y BMP4, lo que indica así la especificidad para activina A.

Ejemplo 8**15 ENSAYOS EN EQUILIBRIO KINEX A™**

Se usaron ensayos de unión en equilibrio basados en disoluciones usando tecnología KinExA™ (Sapidyne Instruments, Inc.) para determinar el equilibrio de disociación (KD) de la unión de activina A a moléculas de anticuerpo. Este ensayo basado en disolución se considera que es más sensible que el ensayo BIAcore en algunos casos. Se pre-recubrió Reacti-Gel™ 6X con aproximadamente 50 μ g/ml de activina A toda la noche, y se bloqueó con BSA. Se incubaron 30pM y 100pM de muestras de anticuerpo con varias concentraciones (0,5 pM a 5 nM) de activina A en tampón de muestra a temperatura ambiente durante 8 horas antes de pasarlas a través de lechos recubiertos con activina A. La cantidad de anticuerpo unido a los lechos se cuantificó por anticuerpo de cabra anti-Fc humano marcado con fluorescencia (Cy5) a 1 mg/ml en superblock. La señal de unión fue proporcional a la concentración de anticuerpo libre en el equilibrio con una concentración de activina A dada. Se obtuvo la KD a partir de la regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio con curva dual proporcionado en el software KinEx A™ (Sapidyne Instruments, Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 8. A1 muestra la afinidad de unión más fuerte para activina A ($K_D \sim 3$ pM). A2 y A3 se unieron a activina A a ~ 15 pM y ~ 8 pM, respectivamente.

Ejemplo 9**30 EFECTOS PROTECTORES DE ANTI-ACTIVINA EN LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL Y MASA MUSCULAR EN UN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO**

Este ejemplo se diseñó para ensayar si inhibidores de activina pueden rescatar la afección de desgaste muscular observada en artritis inducida por colágeno. La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón ampliamente usado que comparte varias características clínicas y patológicas con la artritis reumatoide (RA). Los mecanismos precisos para CIA no se conocen, sin embargo, existe una evidencia considerable para sugerir que CIA es una enfermedad inflamatoria mediada por Th-1. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune común que da lugar a la inflamación de las articulaciones, y erosión progresiva del cartilago/hueso. Incluso si la progresión de RA está bajo control, la pérdida de BCM no se corrige sin una intervención directa adicional.

El modelo de artritis inducida por colágeno se preparó como sigue. Se usaron ratones macho DBA/1J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), de 8 semanas de edad (20-23g). La inmunización se llevó a cabo en el día 1 y día 21 inyectando 1.000g de Colágeno Bovino II (Chondrex, Redmond, WA) emulsionado en 100 μ l de CFA o ICFA, intradérmicamente en la base de la cola. Se usaron tres grupos de diez ratones cada uno. El Grupo 1 (control) sólo recibió vehículo. El Grupo 2 (experimental, inyección de colágeno) recibió sólo vehículo como tratamiento. Al Grupo 3 se inyectó colágeno y se trató con anticuerpo anti-Activina A A1.

45 El índice clínico artrítico usado fue:

0=articulación normal sin signos de artritis

1=hinchazón y/o enrojecimiento de un dedo

2=dos articulaciones implicadas

3= más de dos articulaciones

50 4= artritis grave de la pata completa y dedos

El tratamiento consistió en inyección de anticuerpo activina (s.c.) empezando el Día 8, 5mg/kg, s.c. dos veces a la semana. Los puntos finales medidos fueron peso corporal, masa muscular/grasa, toma de alimentos y citoquinas inflamatorias.

Peso corporal. Los animales CIA no tratados perdieron veinticinco por ciento de su peso corporal y masa muscular comparado con los animales normales, lo que proporcionó la evidencia de caquexia reumatoide. Los tratamientos con anti-activina A (A-1) incrementaron significativamente ($p<0,05$) el peso corporal comparado con el de CIA control pero con los animales control normales.

- 5 Masa muscular. El tratamiento con anticuerpo monoclonal A1 incrementó significativamente la masa muscular ($p<0,05$) en animales CIA, comparado con el de los animales CIA no tratados. En los controles CIA, la masa muscular a los 95 días fue 1,5g; mientras en los animales CIA tratados con anticuerpo, la masa muscular a los 95 días fue 2,5g. Los resultados se muestran en la Figura 1.

- 10 Masa grasa. El anticuerpo anti-activina A no revirtió la pérdida de grasa en los animales CIA. Los resultados se muestran en la Figura 2.

La conservación del peso corporal y masa muscular en los animales tratados proporciona apoyo para los anticuerpos activina A como un terapéutico para mejorar la calidad de vida y disminuir la mortalidad en los que padecen artritis reumatoide.

Ejemplo 10

- 15 XENOINJERTO INTRAMUSCULAR CHO/ACTIVINA EN RATONES DESNUDOS ADULTOS JÓVENES

Células CHO transfectadas de manera estable con activina A (CHO/Activina) se implantaron en ratones CD1 nu/nu adultos jóvenes mediante una inyección intramuscular a varias dosis, 1×10^6 , 5×10^6 , y 10×10^6 . Las mismas dosis de células CHO no transfectadas se inyectaron en grupos separados de ratones como controles. El implante de CHO/Activina indujo una pérdida de peso corporal rápida y drástica comparado con los controles.

- 20 En el día 12, el grupo CHO/control para 1×10^6 células tenía una pérdida de 10% de peso corporal, mientras el grupo CHO/anti-activina A tenía una ganancia de 10% en el peso corporal. Los grupos de 5×10^6 y 10×10^6 células anti-activina A también mostraron incrementos en el peso corporal de aproximadamente 10%, mientras los grupos control de 5×10^6 y 10×10^6 células perdieron 25-30% del peso corporal.

- 25 Los niveles séricos de activina A en ratones se midieron en el día 12 después del implante del xenoinjerto. Los niveles de activina A sérica en los ratones control implantados con CHO parentales fueron < 2 ng/ml. Por el contrario, los ratones que portaban el xenoinjerto CHO/Activina mostraron activina A sérica dramáticamente elevada. Hubo una correlación significativa entre el nivel sérico de activina A y la gravedad de la pérdida de peso corporal como se indica por el análisis estadístico, que indica que la sobreexpresión de activina A es responsable de la pérdida de peso corporal observada en ratones con xenoinjerto CHO/Activina.

- 30 Se implantó a los ratones ($n=14$ por grupo) xenoinjerto CHO/Activina y posteriormente se les inyectó bien vehículo o cada uno de los tres anticuerpos monoclonales anti-activina A, A1, A2 y A3. Doce de catorce de los ratones en el grupo vehículo murieron sobre el día 25 después del implante de CHO/Activina, mientras sólo uno de cuarenta y dos ratones implantados con CHO/Activina en los grupos de tratamiento Mab anti-activina A murieron en ese tiempo. Sobre el día 38, la mayoría de los ratones en los grupos de tratamiento Mab continuaron sobreviviendo bien, con proporciones de supervivencia como sigue: trece de catorce para el grupo A1 y diez de catorce en el grupo A2 o A3.

- 35 Los datos de peso corporal muestran que el tratamiento con Mab anti-activina A, A1 o A2, previno completamente la pérdida de peso corporal en los ratones que portaban el xenoinjerto CHO/Activina, lo que indica que los Mab anti-activina A fueron eficaces para neutralizar la actividad de activina A *in vivo*. Como se muestra en la Figura 3, los datos de RMN revelaron que el tratamiento con Mab anti-activina A, A1 previno la pérdida progresiva de masa magra corporal observada en los ratones que portaban CHO/Activina. El tratamiento con este anticuerpo también causó un incremento en la toma de alimento.

- 40 Los datos de las necropsias indican que el tratamiento con el Mab anti-activina A, A1 y A2, previno la reducción grave en los pesos de la parte magra de los cadáveres observados en los ratones que portan CHO/Activina (Tabla 5). Los datos de las necropsias terminales indican que el tratamiento con el Mab anti-activina A, A1 y A2, previno la reducción grave en masa grasa observados en los ratones que portan el xenoinjerto CHO/Activina (Tabla 5).

- 45 El porcentaje de animales que portan un tumor visible en el sitio del xenoinjerto se analizó durante la necropsia terminal en el día 12 después del implante de CHO/Activina. Como se muestra en la Tabla 5, los datos revelaron que el 80% de los ratones en el grupo vehículo desarrollaron tumores de xenoinjerto visualmente identificables en el sitio de la inyección. Se observó una proporción significativamente disminuida de formación de tumores visibles en los grupos de tratamiento Mab anti-activina A.

Después de la necropsia, todos los tumores visualmente identificables en los sitios de xenoinjerto CHO/Activina se diseccionaron de los animales y se pesaron. Se observó una disminución significativa en la masa tumoral en el grupo de tratamiento Mab activina A comparado con el grupo vehículo (Tabla 5).

Tabla 5

Tratamiento	Masa magra de los cadáveres (g) en el día 12	Tejido graso periuterino (g) en el día 12	Desarrollo del xenoinjerto tumoral, porcentaje de animales, en el día 12	Peso tumoral (g) en el día 12
Ratones desnudos más vehículo	9 ± 0,25	0,18±0,02	No aplicable	No aplicable
CHO/Activina más vehículo	7,5±0,25	0,10±0,02	80%	0,11±,01
CHO/Activina más anticuerpo A-1	9,2±0,25	0,17±0,04	20%	0,01±0,005
CHO/Activina más anticuerpo A-2	8,9±0,25	0,16±0,03	50%	0,01±0,005

Los experimentos anteriores sobre el desarrollo del tumor del xenoinjerto dieron lugar a varias conclusiones respecto al uso de anticuerpos anti-activina A para mejorar la supervivencia del cáncer. La activina A jugó un papel causal en el desarrollo de síndrome de caquexia en ratones desnudos que portaban xenoinjerto CHO/Activina. La pérdida de peso corporal se correlacionó bien con el incremento en el nivel sérico de activina en este modelo. Los Mab anti-activina A previnieron la pérdida de peso corporal y síndrome de caquexia observado en los ratones que portaban tumor de xenoinjerto CHO/Activina. Los Mab anti-activina A suprimieron el crecimiento del xenoinjerto, reduciendo significativamente de esta manera el porcentaje de ratones que portaban tumores de xenoinjerto visibles así como disminuyendo los tamaños de tumor de xenoinjerto. Los Mab anti-activina A previnieron la muerte resultante del xenoinjerto CHO/Activina, estimulando de forma importante la supervivencia de los animales.

Ejemplo 11

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-ACTIVINA A1 EN RATONES AAV-ACTIVINA

La sobreexpresión postnatal de activina A dio lugar a síndrome de desgaste semejante a caquexia grave en ratones C57B1/6. El peso corporal disminuyó durante los días 1, 4, 9 y 11, desde 16 gramso a 14, 12,5, y finalmente 10,5 gramos en el día 11. También hubo una pérdida de peso graso, peso de la parte magra de los cadáveres, y peso del músculo gastrocnemio.

Para determinar si el anticuerpo dirigido a activina A podía aliviar o prevenir los efectos de activina A, se llevaron a cabo los experimentos siguientes. Se inyectaron AAV-Activina o vector AAV vacío (control) a 1×10^{13} pfu/ratón en ratones C57B1/6 machos de 8 semanas de edad (n=10-12) a través de las venas de la cola. La Figura 5 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-Activina A A1 en el cambio del peso corporal en los ratones transducidos en los días 1, 5, 8 y 12. El anticuerpo previno el cambio de peso corporal observado en los ratones control. El tratamiento con anticuerpo mejoró la toma de alimento en este modelo animal.

Ejemplo 12

EFFECTO PROTECTOR DE MAB ANTI-ACTIVINA-A A1 FRENTE A LAS PÉRDIDAS DE PESO CORPORAL Y MASA MAGRA EN UN MODELO DE CAQUEXIA DE CÁNCER DE COLON-26

Este ejemplo demuestra el efecto conservador de músculo del anticuerpo monoclonal anti-Activina-A A-1 en un modelo murino de caquexia por cáncer. El modelo de caquexia por cáncer se estableció usando la inoculación de células de adenocarcinoma de colon 26 murino singénico en ratones CDF1 machos de 8,5 semanas de edad ($0,5 \times 10^6$ células/ratón) en el día 0. El tratamiento con Mab anti-Activina-A A-1 (10 mg/kg, sc) se inició en el día 4 y se proporcionó 3 veces a la semana durante 18 días. Se usó tampón de acetato de sodio (10 mM acetato de sodio, 5% sacarosa, pH 5,0) como vehículo en los ratones del grupo control que portaban tumor. Un grupo de ratones CDF1 normales de edad y peso equivalente sin tumores se usó como control de línea base paralelo. El peso corporal y toma de alimento se monitorizaron tres veces a la semana. El tamaño tumoral se midió tres veces por semana con calibradores digitales. La composición corporal se midió usando RMN al comienzo y final del estudio para monitorizar los cambios en la masa magra y grasa. Al final del experimento, los ratones se sacrificaron por eutanasia en una cámara de CO₂. Se recogieron muestras de bloque terminales y los niveles séricos de Activina-A se analizaron por ELISA. Las partes magras de los cadáveres se pesaron y registraron, y los músculos gastrocnemio y los tumores se pesaron y se almacenaron apropiadamente.

Todos los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Se realizó un ensayo T no emparejado para determinar la diferencia estadística entre los grupos usando software Graph Pad Prism. La significancia estadística del vehículo se representó por valores p menores de 0,05.

- 5 Los datos muestran que los ratones tratados con A-1 tenían un peso corporal significativamente mayor que los ratones tratados con vehículo ($21,30 \pm 0,54$ g frente a $19,21 \pm 0,38$ g, $P < 0,05$, Día 15 y $19,66 \pm 0,22$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $P < 0,05$, día 18). Hubo una pérdida de peso corporal significativa en los ratones que portaban tumor tratados con vehículo comparado con los ratones que no portaban tumor con edad equivalente ($25,48 \pm 0,35$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $p < 0,005$). Así, el tratamiento con anticuerpo activina A ayudó a mantener el peso corporal.
- 10 El crecimiento tumoral se monitorizó con una medida de calibradores digitales y el tamaño tumoral se calculó con la ecuación de: Dimensión tumoral (mm^3) = L (mm) * W (mm) * W (mm) * 0,5. El tamaño tumoral no fue diferente entre los dos grupos tratado con anticuerpo A1 y tratado con vehículo.
- 15 Después de la inoculación de las células tumorales C-26, los ratones en el grupo tratado con vehículo tuvieron una pérdida de peso corporal dramática comparado con los ratones que no portaban tumor ($25,48 \pm 0,35$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $p < 0,01$). Sin embargo, el tratamiento con A-1 atenuó la pérdida de peso media ($19,66 \pm 0,22$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $P < 0,05$).
- El tratamiento con A-1 resultó en una conservación significativa de la masa muscular esquelética. Los ratones tratados con A-1 tuvieron un peso mayor de la masa del músculo gastrocnemio ($0,099 \pm 0,002$ g frente a $0,093 \pm 0,001$, $p < 0,05$) que la del grupo tratado con vehículo C26.
- 20 Al final del experimento, se llevó a cabo disección del tejido terminal. Los ratones que portaban tumor C-26 control tuvieron un peso de la parte magra de los cadáveres significativamente menor ($6,75 \pm 0,11$ g) que la de los ratones tratados con anticuerpo A1 ($7,20 \pm 0,16$ g, $p < 0,05$ frente a C-26 + grupo vehículo).
- La masa magra corporal se perdió de forma importante en el grupo tratado con vehículo C-26 ($-1,85 \pm 0,24$ g comparado con su masa magra corporal inicial). El tratamiento con A-1 en ratones que portaban tumor C-26 atenuó significativamente la pérdida de masa magra corporal ($-0,60 \pm 0,26$ g, $p < 0,05$ frente a grupo C26-vehículo).
- 25 El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-Activina A A1 es eficaz en la atenuación de la pérdida de peso corporal total inducida por caquexia por cáncer. El efecto protector del anticuerpo A1 está asociado con la conservación de la masa muscular esquelética, masa magra de los cadáveres y masa magra corporal total en un modelo animal de caquexia por cáncer murino bien establecido.
- 30 El presente estudio proporciona evidencia preclínica de que la neutralización de activina A usando el anticuerpo monoclonal A1 atenuó significativamente la pérdida de peso corporal y conservó la masa muscular esquelética y masa magra corporal.

Ejemplo 13

ELISA DE ACTIVINA A

- 35 Los anticuerpos frente a activina A pueden usarse para ensayar y cuantificar activina A en muestras, tales como muestras biológicas. Se adquirieron activina A humana recombinante (100 ng/ml, cat #10-85106) y tampón de dilución de ensayo (0 mg/ml, cat #10-85101) en DSLabs (Webster, Tejas) y se almacenaron a 4°C. Se prepararon estándares frescos antes del experimento diluyendo en tampón de ensayo.

- 40 Los sueros humanos se obtuvieron en Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY). Los sueros para la medida de activina A se alicuotaron en 110 μ l para minimizar la variación debida a congelación-descongelación. Las muestras se diluyeron 1/3 con tampón de ensayo y se midieron en el ELISA.

El ELISA de Activina A (ELISA en una etapa) se lleva a cabo usando las etapas siguientes:

- 45 Se recubrieron placas de 96 pocillos Corning Costar 3590 con 100 μ l de 4 μ g/mL Mab anti-activina A (A2) toda la noche a temperatura ambiente mientras se agitaba suavemente a 500-600 rpm. Los pocillos (400 μ l/pocillo) se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,02% (v/v) Tween 20. Los pocillos se bloquearon en 300 μ l de tampón de bloqueo I durante dos horas a temperatura ambiente y el tampón de bloqueo se eliminó.

- 50 Se añadieron 100 μ l de activina A estándar / ó 100 μ l de muestras diluidas, y se añadieron 25 μ l de 0,5 μ g/mL mAb anti-activina A marcado con HRP (A1/HRP) en tampón de ensayo. Para las medidas de activina A libre, los sueros se diluyeron en 1/3 con tampón de ensayo. Para las medidas de activina A total, los sueros se (1) acidificaron (pH 4-5) con 20% HCL (2 μ l por 110 μ l de suero), (2) incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, (3) neutralizaron por la adición de 2 μ l de 5 N NaOH (2 μ l por 110 μ l de suero), y (4) diluyeron en 1/3 con tampón de ensayo.

La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente mientras se agitaba a 600-700 rpm. Los pocillos (400 μ l/pocillo) se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,02% (v/v) Tween-20. Se añadieron 100 μ l de

TMB (R&D System, Minneapolis, MN), seguido de una incubación durante veinte minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de disolución de parada (R&D System, Minneapolis, MN). La medida de DO se llevó a cabo usando 450 nm en Molecular Device SpectraMax M5.

- 5 Se generó una curva estándar representando la absorbancia a 450 nm frente al log de la concentración de rh-activina, usando un programa de ajuste de curva log-log (o logístico de cinco parámetros) de Molecular Device. Los valores para las concentraciones de las muestras se obtuvieron por interpolación de su absorbancia del estándar.

El Anticuerpo de Captura fue mAb A-3 anti-activina A, 20,78 mg/ml. El Anticuerpo de Detección fue mAb A-1 anti-activina A-HRP, 0,65 HRP/Ab, 12,05 mg/ml. El Tampón de Bloqueo fue tampón de bloqueo I. El tampón de lavado fue PBS / 0,1 % Tween-20. El tampón de ensayo (Diluyente de Reactivo) fue tampón 0 mg/ml activina A.

10 Ejemplo 14

ANÁLISIS DE PROTECCIÓN FRENTE A PROTEASA DE ACTIVINA A

- 15 Los ensayos de protección de proteasa se llevaron a cabo con el fin de identificar la unión al epítipo de anticuerpos activina A. Se analizó una preparación de activina A humana recombinante degradada por tres métodos. El primer método examinó una preparación de activina A que se había degradado durante la purificación. El segundo método incluyó proteólisis de la preparación de activina A con Lisina C, quimiotripsina, pepsina y termolisina. El tercer método incluyó la degradación química de la preparación usando bromuro de cianógeno.

- 20 Así, para la proteólisis del complejo activina humana y anticuerpo, se mezclaron 5 microgramos de activina A y 90 microgramos de anticuerpo en 100 microlitros de 0,1 M bicarbonato de amonio (pH 7,8) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos antes del tratamiento con 2% en peso de la proteasa particular seleccionada. Se dejó que se produjera la digestión de la proteína a 37 grados Celsius durante 90 minutos. Las muestras control que contenían activina A sola o anticuerpo solo se llevaron a cabo de una manera idéntica. Las muestras se acidificaron antes del análisis RP-HPLC.

- 25 Para la digestión con bromuro de cianógeno de activina A, se generaron fragmentos CNBr de activina A incubando 10 microgramos de la proteína con CNBr en 100 microlitros de 90% TFA toda la noche a temperatura ambiente. La muestra se dejó en oscuridad a lo largo de la incubación y se secó en vacío antes del análisis RP-HPLC.

- El RP-HPLC se utilizó para analizar los fragmentos generados como se ha descrito anteriormente. Brevemente, la columna se equilibró con disolvente, la muestra se inyectó y la columna se lavó con disolvente antes de aplicar un gradiente lineal. El efluente de la columna se monitorizó por absorbancia a 215 nm. Las muestras eluidas se recogieron manualmente y se analizaron por degradación de Edman y espectrometría de masas.

- 30 La preparación que se había degradado durante la purificación contenía las especies siguientes:

1. Gly¹-His⁵⁹ (6.456,2 Da)
2. Ser⁶⁰-Tyr⁹⁴ (4.102,9 Da)
- 3.- Asp⁹⁵-Ser¹¹⁶ (2.452,8 Da)
4. Gly¹-Tyr⁹⁴ (10.541,1 Da)

- 35 La preparación que se había degradado por una actividad semejante a quimotriptica tenía las especies siguientes escindidas en las localizaciones indicadas en SEQ ID NO: 225:

1. ₁GLECDGKVNICKKKQFFVSFKDIGWNDII³⁰
2. ₃₁APSGYHANYCEGECPSHIAGTSGSSLSFH↓S₆₀
3. ₆₁TVINHYRMRGHSPFANLKSCCVPTKLRPMS₉₀
4. ₉₁MLYY↓DDGQNIKKDIQNMIVEECGCS₁₁₆

Las especies mostradas en la Figura 9 indican las localizaciones de sitios de escisión cuando la preparación de activina A se degradó con quimiotripsina, Lisina C (LysC), o Bromuro de Cianógeno (CNBr).

Ejemplo 15

ENSAYO DE UNIÓN A ACTIVINA A

- 45 Los anticuerpos monoclonales A1, A2, y A3 se unen a activina A pero no a activina B, según las afinidades de unión listadas en la Tabla 6. Así, se llevó a cabo un análisis de afinidad de los anticuerpos de activina A A1, A2, y A3 con el fin de determinar la región o estructura necesaria para la unión del anticuerpo neutralizante. Se conocen varias

proteínas de unión a activina A, incluyendo ActRII (A/B), ActRI (A/B)(Alt4), folistatina, y gen relacionado con folistatina (FLRG).

- 5 Los ensayos de unión se llevaron a cabo para cribar anticuerpos con el fin de evaluar su capacidad para unirse a superficies de anticuerpo inmovilizados (activina A y/o activina B). Los ensayos de unión se llevaron a cabo utilizando 2 nM rhActivina A y 20 nM de cada anticuerpo inmovilizado en una superficie. Los anticuerpos siguientes se inmovilizaron en una superficie y se ensayaron: AKA1 (disponible comercialmente), AKA2 (disponible comercialmente), A1, y A3. Los resultados del ensayo con anticuerpo se indican en la Figura 10.

Ab Anti-Activina A	A2	A3	A1	AKA1	AKA2
Activina A	$K_D \sim 25 \text{ pM}$	$K_D \sim 11 \text{ pM}$	$K_D \sim 3 \text{ pM}$	$K_D \sim 4 \text{ pM}$	$K_D \sim 4 \text{ pM}$
Activina B	-----	-----	-----	-----	-----

Ejemplo 16

10 MAPEO DE REGIÓN DEL ENSAYO DE UNIÓN DE ACTIVINA A (BIAcore)

- Se llevaron a cabo ensayos de bloqueo en superficies con quimera de activina humana recombinante RIB-Fc inmovilizada, superficies con quimera de activina humana recombinante RIIB-Fc, y superficies con quimera recombinante RIIA-Fc humana recombinante, como se describe en el Ejemplo 5. Los anticuerpos monoclonales A1, A2, AKA1, y AKA2 en cada superficie quimera se incubaron con 1nM activina A, y se midió la respuesta de unión 15 relativa (%). Una respuesta de unión incrementada en presencia de anticuerpos indica que la activina A es capaz de unirse a las superficies de receptor inmovilizado y los anticuerpos en disolución simultáneamente, lo que se refiere como "carry on". Los resultados se indican en la Tabla 7 y Figura 11, en las que CE50 significa la concentración eficaz que rinde 50% de unión.

Tabla 7

CE50 (nM)	Quimera rhActivina RIB/Fc	Quimera rhActivina RIIB/Fc	Quimera rhActivina RIIA/Fc
AKA1	Parcialmente bloqueado	0,30	0,35
AKA2	Parcialmente bloqueado	0,36	0,37
A1	0,29	0,29	0,29
A2	0,18	Carry on	Carry on

20

Ejemplo 17

QUIMERAS ACTIVINA A/B

- 25 Las quimeras activina A/B se generaron con el fin de evaluar adicionalmente las capacidades de unión a epítipo de los anticuerpos monoclonales A1, A2, y A3, como se describe en los Ejemplos 5 y 16. Como se indica en la Figura 12, se ensayaron dos quimeras: Activina A 13/39 B (que contiene los aminoácidos 1-116 de activina A excepto que los aminoácidos en las posiciones 13-39 de activina A están sustituidos con los aminoácidos correspondientes en las posiciones 13-39 de activina B-SEQ ID NO: 243), y activina A 82/107 B (que contiene los aminoácidos 1-116 de activina A excepto que los aminoácidos en las posiciones 82-107 de activina A están sustituidos con los aminoácidos correspondientes en las posiciones 82-107 de activina B-SEQ ID NO: 244).

- 30 Brevemente, un clon de activina A de longitud completa se usó como un molde para la amplificación por PCR usando polimerasa Pfu ultra (Stratagene) y cebadores (SEQ ID NO: 245 y SEQ ID NO: 246) al inicio de la secuencia de proteína madura. El producto de PCR resultante se purificó por columna (Qiagen), se digirió con las enzimas de restricción Sall y XbaI (Roche) y se aisló por gel (Qiagen). Los casetes de gen sintéticos que contienen las secuencias de proteína madura se diseñaron utilizando las secuencias de aminoácidos de activina A y activina B de 35 longitud completa y retro traduciendo en secuencias de ADN optimizadas con codones para la expresión en una célula huésped de mamífero usando el programa Gene Designer (Versión 1.0.4, DNA 2.0, Inc.) (BMC Bioinformatics, 7: 285 (2006)). Las secuencias se digirieron con XbaI y NotI y se aislaron por gel. El producto de PCR de activina A se ligó en condiciones de reacción estándar usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs, Inc.) bien con el

5 fragmento de gen sintético 13-39 (SEQ ID NO: 247) o el fragmento de gen sintético 82-107 (SEQ ID NO: 213) y un vector de expresión digerido con Sall/NotI (pDRSalpha 24) para producir construcciones de expresión de longitud completa. La construcción génica sintética de activina A con los aminoácidos 13-39 reemplazados por la secuencia de activina B (SEQ ID NO: 247) y la construcción génica sintética de activina A con los aminoácidos 82-107 reemplazados por la secuencia de activina B (SEQ ID NO: 248) se utilizaron en los experimentos de mapeo de epítopos (resultados mostrados en la Figura 14).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Amgen Inc.	
5	<120> ANTICUERPOS ANTI-ACTIVINA A Y USOS DE ÉSTOS	
	<130> FB21339	
	<150> 60/843,430	
10	<151> 2006-09-08	
	<150> 60/956,653	
	<151> 2007-08-17	
15	<160> 247	
	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0	
	<210> 1	
20	<211> 318	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
25	tcctatgagg tgactcaggc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60	
	acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttggt ggtatcagca gaagccaggc 120	
	cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180	
	ttctctgggt ccaactctgg aaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240	
	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300	
	accaagctga ccgtccta 318	
	<210> 2	
	<211> 366	
30	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60	
	tcctgcaagg cttctgggtta caccctttacc agttatggtc tcagctgggt gcgacaggcc 120	
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcatccctt acaatggtaa cacaaactct 180	
	gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240	
	atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagacagg 300	
	gactacgggtg tcaattatga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360	
35	tcttca 366	
	<210> 3	
	<211> 33	
	<212> ADN	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
45	tctggagata aattggggga taaatatgct tgt 33	
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 4	
	caagatagca agcggccctc a 21	
55	<210> 5	
	<211> 27	

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5

5 caggcgtggg acagcagcac tgcggta 27

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6

15 ggttacacct ttaccagtta tggctcagc 30

<210> 7
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

25 tggatcatcc cttacaatgg taacacaaac tctgcacaga aactccaggg c 51

<210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <400> 8

gacagggact acggtgtcaa ttatgatgct ttgatatc 39

35 <210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 9

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

<210> 10
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr

50

ES 2 528 798 T3

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

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

<400> 11

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Gly
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

```
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
```

<213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

5 1 5

<210> 17
<211> 321
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

15 <210> 18
<211> 373
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 18

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300
aactggaact acgacaacta ctactacggt ctggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cag 373

25 <210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <400> 19

cgggcaagtc agggcattag aaataattta ggc 33

<210> 20
35 <211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20

40 gctgcatcca gtttgcaag t 21

<210> 21
<211> 27
45 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21

50 ctacagcata atagtaccg gtggacg 27

<210> 22
<211> 30
<212> ADN
55 <213> Homo sapiens

<400> 22

5 ggattcacct tcagtagtta cggcatgcac 30

<210> 23
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 23

gttatatggt atgatggaag taataaatac catgcagact ccgtgaaggg c 51

15 <210> 24
<211> 45
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 24

agtcggaact ggaactacga caactactac tacggtctgg acgtc 45

25 <210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 25

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

<210> 26
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 26

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

40

5 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Gly
 1 5 10
 10 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 28
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 20 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 29
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 30 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 30
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5 10
 40 <210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 45 Gly
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 55 <210> 33
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 33

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagatthttg caacttatta ctgtcgacag caaaatactt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

5 <210> 34
<211> 369
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 34

```
gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagt agttattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg cgtggccaac ataaagcaag atggaagtga ggaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggtagc 300
agcagctgggt actactacaa ctacgggatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
```

15 <210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 35

```
cgggcaagtc agggcattag aaatgattta ggc 33
```

<210> 36
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 36

```
30 gctgcatcca gtttcaaag t 21
```

<210> 37
<211> 27
<212> ADN
35 <213> Homo sapiens

<400> 37

```
40 cgacagcaaa atactaccc gctcact 27
```

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 38

```
ggattcacct ttagtagtta ttgatgagc 30
```

50 <210> 39
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

55 <400> 39

aacataaagc aagatggaag tgaggaatac tatgtggact ctgtgaaggg c 51

<210> 40
 <211> 42
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40

10 ggtagcagca gctggtacta ctacaactac ggtatggacg tc 42

<210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

25 <400> 42

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

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

35 <400> 43

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp	Leu	Gly
1				5					10	

<210> 44

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

5 <400> 44
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Arg Gln Gln Asn Thr Tyr Pro Leu Thr
 15 1 5

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 25 1 5 10

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

35 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 48
 Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

45 <210> 49
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 50 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtactg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc ttttcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt gggtcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tggtggggtt tattactgca tgcaagctct ccaaactccg 300
 tgcagttttg gccaggggac caagctggag atcaag 336

<210> 50
 <211> 363
 55 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 50

```
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagattcg 300
gggtatagca gcagctggca ctttgactac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
tca 363
```

5

<210> 51
<211> 48
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10

<400> 51

aggctagtc agagcctct gcatagtact ggatacaact atttggat 48

15

<210> 52
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20

<400> 52

ttgggttctt ttcgggcctc c 21

25

<210> 53
<211> 26
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30

<400> 53

atgcaagctc tccaaactcc gtgcag 26

35

<210> 54
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 54

40

ggatacacct tcaccggcta ctatatccac 30

45

<210> 55
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 55

50

tggatcaacc ctaacagtgg tggcacaac tatgcacaga agtttcaggg c 51

55

<210> 56
<211> 36
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 56

gattcggggg atagcagcag ctggcacttt gactac 36

60

<210> 57

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 57

```

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

<210> 58
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 58

15

```

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

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 59

```

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys
 1           5           10
    
```

25

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 60

```

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1           5
    
```

35

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val

5 1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Leu Ser

15 1 5 10

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 63

Trp Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Ser Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

25 <210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 64

Asp Arg Asp Tyr Gly Val Asn Tyr Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 65

35 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 65

40 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcacctgca agtccagcca gagtatttta tacagttcca acaataagaa gtatctagtt 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgatca tttactggac atctatgcgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcaacagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 66

<211> 488

45 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 66

ES 2 528 798 T3

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaat agtttctact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaat 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaccca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agacagtata 300
gcagccccct ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctcctc agcttccacc 360
aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
tgcgcctt

```

<210> 67

<211> 51

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 67

10 aagtcagcc agagtatctt atacagtcc aacaataaga agtatctagt t 51

<210> 68

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 68

20 tggacatcta tgcgggaatc c 21

<210> 69

<211> 27

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 69

cagcaatatt atagtactcc gtggacg 27

30 <210> 70

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <400> 70

ggtggctcca tcaatagttt ctactggagc 30

<210> 71

40 <211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 71

45 tatatctatt acagtgggag caccaactac aatccctccc tcaagagt 48

<210> 72

<211> 27

50 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 72

55 gacagtatag cagccccctt tgactac 27

<210> 73

<211> 113

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

5

```

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

```

<210> 74
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 74

```

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

```

15

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 75

```

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu
 1           5           10           15
Val

```

25

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 76

```

Trp Thr Ser Met Arg Glu Ser
 1           5

```

35

<210> 77
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

5 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 78
<211> 10
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

15 Gly Gly Ser Ile Asn Ser Phe Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 79
<211> 16
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

25 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 80
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

35 Asp Ser Ile Ala Ala Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 81
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

40 <400> 81

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg taagttacta ctgtcaacag agttacagta tttcgccac tttcggcggc 300
gggaccaagg tggagaacaa a 321

45 <210> 82
<211> 357
<212> ADN
<213> Homo sapiens

50 <400> 82

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtoccttcagt gcttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaggcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agtacagtgg 300
ctcgaactgg cctactttga ctactgggac cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 83

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 83
 cgggcaagtc agagcattag caactattta aat 33
 <210> 84
 10 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 15

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

 <210> 85
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 25 caacagagtt acagtatttc gccact 27
 <210> 86
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 35 ggtgggtcct tcaagtctta ctactggagc 30
 <210> 87
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 87
 gaaatcaatc atagtgagg caccaactac aaccgtccc tcaagagt 48
 45 <210> 88
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 88
 gtacagtggc tcgaactggc ctacttgac tac 33
 <210> 89

<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 89

```

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

```

<210> 90
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

15

```

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

```

<210> 91

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

<400> 91

25 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 92

```

Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser
 1           5

```

35

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Thr
1 5

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Glu Ile Asn His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Val Gln Trp Leu Glu Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 97

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 97

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaggta gggcattaga aatgatttag tctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcc gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggtcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatactt acccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 98

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 98

cagggtgcagc tgggtggactc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcatt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggtctggagt ggtggcagtt atctggtatg atggaagtac tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
cagtggctct accactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 99

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 99

cgggcagggtc agggcattag aaatgattta gtc 33

<210> 100
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 100

15

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

<210> 101
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 101

25 ctacaacata atacttacc attcact 27

<210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30

<400> 102

35 ggattcacct tcattagcta tggcatgcac 30

<210> 103
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40

<400> 103

gttatctggt atgatggaag tactgaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

45 <210> 104
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 104

gagaggcagt ggctctacca ctacggtatg gacgtc 36

<210> 105

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 105

```

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

<210> 106
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 106

15

```

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

<210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 107

25

```

Arg Ala Gly Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Val
 1           5           10
    
```

<210> 108
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 108

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

<210> 109

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Phe Thr

10 1 5

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 110

Gly Phe Thr Phe Ile Ser Tyr Gly Met His

20 1 5 10

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 111

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Thr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

30 <210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 112

Glu Arg Gln Trp Leu Tyr His Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 113

40 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 113

45

ES 2 528 798 T3

```

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcacctgca agtccagcca gagtatctta tacagctcca acaataagaa gtatctagtt 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagttgatca tttactggac atctatgcgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaa 339

```

<210> 114

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 114

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcaat agtttctact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaat 180
ccctccctca agaggcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaccca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agacagtata 300
gcagcccctt ttgactactg gggccaggga accctgttca ccgtctcctc a 351

```

10

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

20 <223> Xaa = Arg O Lys

<220>

<221> VARIANTE

<222> 6

25 <223> Xaa = Leu O Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

30 <223> Xaa = His O Tyr

<220>

<221> VARIANTE

<222> 10

35 <223> Xaa = Thr O Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> 11

40 <223> Xaa = Gly O Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> 12

45 <223> Xaa = Tyr O Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)...(13)

50 <223> Xaa = Asn O Lys

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)...(14)

55 <223> Xaa = Lys O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)...(17)
 <223> Xaa = Asp O Val
 5
 <400> 115

 Xaa Ser Ser Gln Ser Xaa Leu Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu
 1 5 10 15
 Xaa
 10 <210> 116
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Ser O Gly
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Ser O Gly
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Ser O Arg
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr O Asp O Asn
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Asp O Val O Gly
 40 <400> 116

 Arg Ala Xaa Gln Xaa Ile Xaa Asn Xaa Leu Xaa
 1 5 10
 45 <210> 117
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 117
 50 cagcaatatt atagtactcc gtggacg 27

 <210> 118
 <211> 30
 55 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 118
 60 ggtggctcca tcaatagttt ctactggagc 30

 <210> 119
 <211> 48

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 119

5 tataatctatt acagtgggag caccaactac aatccctccc tcaagagg 48

<210> 120
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 120

15 gacagtatag cagccccctt tgactac 27

<210> 121
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

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

<210> 122
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

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

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Glu O Asp
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Trp O Leu
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Glu O Asp
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr O Phe
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa = Ala O Val
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Cys O Phe
 30
 <400> 123

Ser Gly Xaa Lys Xaa Gly Xaa Lys Xaa Xaa Xaa
1 5 10
 35 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Ala O Trp O Leu
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Thr O Ala O Gly
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Ser O Met O Phe
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Leu O Arg
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Gln O Glu O Ala
 65 <400> 124

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Ser
1 5
 5 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 10 **Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr**
1 5
 <210> 126
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126
 20 **Gly Gly Ser Ile Asn Ser Phe Tyr Trp Ser**
1 5 10
 <210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 127
 30 **Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg**
1 5 10 15
 <210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Gln O Leu O His
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Thr O Asn O Ser
 45 <400> 128
 50 **Xaa Asp Xaa Lys Arg Pro Ser**
1 5
 <210> 129
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 129
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaagccc ctaagcgcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 130
 <211> 372
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 130

 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300
 aactggaact acgacaacta ctactacggt ctggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372
 10
 <210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Thr O Ser
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Pro O Thr
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Phe O Trp
 30
 <400> 131

 Leu Gln His Asn Xaa Tyr Xaa Xaa Thr
 1 5
 35 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Met O Gln O Arg
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Ala O Tyr O Gln O Ser
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Leu O Tyr O Asn
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Gln O Ser O Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Thr O Tyr O Ile
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Pro O Ser
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Cys O Trp O Leu O Pro
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9) ... (9)
 <223> Xaa = Ser O Thr
 20
 <400> 132

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
 25 <210> 133
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 133

 ctacagcata atagtaccc gtggacg
 35 <210> 134
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Ile O Phe
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Asn O Ser
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Ser O Ala
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Gly O -Xaa (Xaa deleccionado)
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Gly O -Xaa (Xaa deleccionado)
 65 <220>
 <221> VARIANTE

27

<222> 9
 <223> Xaa = Phe O Tyr

<400> 134

5 Gly Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Trp
 1 5 10

<210> 135
 <211> 51
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 135

15 gttatatggt atgatggaag taataaatac catgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 136
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 136

25 agtcggaact ggaactacga caactactac tacggtctgg acgtc 45

<210> 137
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 137

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

35 <210> 138
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 138

ES 2 528 798 T3

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

<210> 139

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 2

<223> Xaa = Tyr O Phe

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> 3

<223> Xaa = Tyr O Ser

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> 5

<223> Xaa = Thr O Ser O Ile

<220>

<221> VARIANTE

25 <222> 6

<223> Xaa = Gly O Ser

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> 8

<223> Xaa = Tyr O Gly O Trp

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> 9

<223> Xaa = Ile O Met

<220>

<221> VARIANTE

40 <222> (10)...(10)

<223> Xaa = His O Gly

<400> 139

Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa

45 1 5 10

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Tyr O Phe
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Thr O Ser
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Ser O Ala
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Gly O Trp
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Leu O Met O Ile
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa = Ser O His
 30
 <400> 140

 Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 35 <210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 141

 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 45 <210> 142
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Tyr O Glu
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Ser O Tyr O Asn
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Tyr O His
 <220>

<221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Ser O Gly

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr O Asn

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 16
 <223> Xaa = Ser O Arg

15 <400> 142

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Xaa
 1 5 10 15

<210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 143

25 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

35 Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 145
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 145

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagaaaaatg gggagagaaa tatgcttgtt ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgctggtcat ctatcaagat accaagcggc cctccgggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccatttctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacaggagca ctgtattcgg cggagggacc 300
 aagctgaccg tccta 315

45 <210> 146
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 146

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtcagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt ggcgcagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaagga 300
 ctgggggttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 147
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 147

 10 tctggagaaa aatggggaga gaaatatgct tgt 33
 <210> 148
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 148 21

 caagatacca agcggccctc c 21
 20 <210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 149 24

 caggcgtggg acaggagcac tgta 24
 30 <210> 150
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 150 30
 ggatacagct ttaccagcta ctggatcggc 30
 40 <210> 151
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 151
 45 atcatctatc ctggtgactc tgataccaga tacagcccgt ccttccaagg c 51
 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 152

 caaggactgg ggttgacta c 21
 55 <210> 153
 <211> 105
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 153

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

<210> 154
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 154

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

<210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 155

Ser Gly Glu Lys Trp Gly Glu Lys Tyr Ala Cys
 1 5 10

<210> 156
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 156

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 157
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 157

Gln Ala Trp Asp Arg Ser Thr Val
 1 5

<210> 158
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 158
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5 10
 10
 <210> 159
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 159
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 20
 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 160
 25
 Gln Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5
 30
 <210> 161
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgctttct ggtatcagct gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgcggctg acttttactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtggtatt cggcggaggg 300
 35
 accaagctga ccgtccta 318
 <210> 162
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 162
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct cttacagtgg gagcacctac 180
 tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgcgcgct 300
 tacggtgact atcgcggctg gttcgacccc tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 360
 45
 tca 363
 <210> 163
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 163

	tctggagata aattggggga taaattgct ttc	33
	<210> 164	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 164	
10	caagataaca agcggccctc a	21
	<210> 165	
	<211> 27	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 165	
20	caggcgtggg acagcagcac tgtggta	27
	<210> 166	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 166	
	ggtggctcca tcagcagtgg tggttactac tggagc	36
30	<210> 167	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 167	
	tacatctctt acagtgggag cacctactac aaccggtccc tcaagagt	48
	<210> 168	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 168	
45	gcttacggtg actatcgcg ctggttcgac ccc	33
	<210> 169	
	<211> 106	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 169	

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

<210> 170
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 170

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

<210> 171
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 171

20 Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Phe
 1 5 10

<210> 172
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 172

30 Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

<400> 173

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 1 5

<210> 174
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 174

 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5 10
 10
 <210> 175
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 175

 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 20
 <210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 176

 Ala Tyr Gly Asp Tyr Arg Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10
 30
 <210> 177
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 177
 35
 gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattgtg caacttatta ttgtctacag cataatagtt atacgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

 <210> 178
 <211> 372
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 178

 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt gcctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcatcatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaagtcgg 300
 aactggaact acgactccta ccaatacggc ttggacgtct ggggccaagg gaccacgggtc 360
 45 accgtctcct ca 372

 <210> 179
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 1
 <223> Xaa = Asn O Val

 <220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Trp O Lys

 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Tyr O Gln

 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Asn O Glu O Ser

 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Lys O Glu

 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = His O Tyr

 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Ala O Val

 <400> 179
 35 **Xaa Ile Xaa Xaa Asp Gly Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Asp Ser Val Lys**
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 180
 <211> 17
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> 1
 <223> Xaa = Trp O Ile

 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> 3
 <223> Xaa = Asn O Ile O Ser O Tyr

 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> 4
 <223> Xaa = Pro O Ala

 <220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> 5
 <223> Xaa = Asn O Tyr O Gly

 <220>
 <221> VARIANTE

	<222> 6	
	<223> Xaa = Ser O Asn O Asp	
	<220>	
5	<221> VARIANTE	
	<222> 7	
	<223> Xaa = Gly O Ser	
	<220>	
10	<221> VARIANTE	
	<222> (8) ... (8)	
	<223> Xaa = Gly O Asn O Asp	
	<220>	
15	<221> VARIANTE	
	<222> (10) ... (10)	
	<223> Xaa = Asn O Arg	
	<220>	
20	<221> VARIANTE	
	<222> (11)...(11)	
	<223> Xaa = Tyr O Ser	
	<220>	
25	<221> VARIANTE	
	<222> (12)...(12)	
	<223> Xaa = Ala O Ser	
	<220>	
30	<221> VARIANTE	
	<222> (13)...(13)	
	<223> Xaa = Gln O Pro	
	<220>	
35	<221> VARIANTE	
	<222> (14)...(14)	
	<223> Xaa = Lys O Ser	
	<220>	
40	<221> VARIANTE	
	<222> (15)...(15)	
	<223> Xaa = Phe O Leu	
	<400> 180	
45	Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln	
	1 5 10 15	
	Gly	
	<210> 181	
	<211> 27	
50	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 181	
55	ctacagcata atagttatac gtggacg	27
	<210> 182	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Homo sapiens	
	<400> 182	
	ggattcacct tcagtcgcta tggcatgcac	30

<210> 183
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 183

 10 gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

 <210> 184
 <211> 45
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 184

 agtcggaact ggaactacga ctctaccaa tacggtttg acgtc 45

 20 <210> 185
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 185

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

 30 <210> 186
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 186

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

 40 <210> 187
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
5 <222> 1
<223> Xaa = Val O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> 2
<223> Xaa = Gln O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
15 <222> 3
<223> Xaa = Asp O Trp O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
20 <222> 4
<223> Xaa = Ser O Leu O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> 5
<223> Xaa = Ile O Glu O Gln

<220>
<221> VARIANTE
30 <222> 6
<223> Xaa = Ala O Leu O Gly

<220>
<221> VARIANTE
35 <222> (7)...(7)
<223> Xaa = Ala O Leu

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (8)...(8)
<223> Xaa = Pro O Tyr O Gly

<400> 187

	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Asp	Tyr
45	1				5					10	

<210> 188
<211> 13
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
55 <222> 1
<223> Xaa = Asp O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
60 <222> 2
<223> Xaa = Gln O -Xaa (Xaa deleccionado)

<220>
<221> VARIANTE
65 <222> 3
<223> Xaa = Asp O Ala

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 5 <223> Xaa = Tyr O Gly

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 10 <223> Xaa = Ser O Tyr

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 15 <223> Xaa = Ser O Arg

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 20 <223> Xaa = Phe O -Xaa (Xaa deletado)

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 25 <223> Xaa = Gly O Asp

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 30 <223> Xaa = His O Pro

 <400> 188

 Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 35
 <210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 189

 Leu Gln His Asn Ser Tyr Thr Trp Thr
 1 5
 45
 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 190

 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Gly Met His
 1 5 10
 55
 <210> 191
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 191

 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 192
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 192

 Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 10
 <210> 193
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 193

 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgtttgtt ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg aactgggtcat ctatctagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctgggt ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca cggatttcgg cggagggacc 300
 aaactgaccg tcctg 315
 20
 <210> 194
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 194

 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagag gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca catcaacgac cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gattactatg atagtagtgg ttggggccac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363
 30
 <210> 195
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 195
 35
 tctggagata aattggggga taaatatgtt tgt 33

 <210> 196
 <211> 21
 40
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 196
 45
 ctagataaca agcggccctc a 21

 <210> 197
 <211> 24
 <212> ADN
 50
 <213> Homo sapiens

 <400> 197

 caggcgtggg acagcagcac ggta 24
 55

<210> 198
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 198
 ggttacacct ttaccagcta tggatcagc 30
 10 <210> 199
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 199
 tggatcagcg cttacaatgg taacacaaac tatgcacaga agttccaggg c 51
 20 <210> 200
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 200
 gatcaagatt actatgatag tagtggttg ggccac 36
 30 <210> 201
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 35 <210> 202
 <211> 121
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 202

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

<210> 203

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Cys
 1 5 10

10

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 204

Leu Asp Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

20

<210> 205

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 205

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val
 1 5

30

<210> 206

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

35

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 207

<211> 17

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

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

45

Gly

<210> 208

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

5 <400> 208

Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Trp Gly His
 1 5 10

<210> 209
 <211> 316
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 209

15

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agcctccatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgctttct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgctgggtct ctatcatgat accaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actatcactg tcaggcgtgg gacagcagca cggctctcgg cggagggacc 300
 aagctgaccg tcctac 316

<210> 210
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 210

cagggttcagc tgggtgcaatc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaaga cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagccctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgcg atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
 gattactatg atagtagtgg ttggggacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tcg 363

25

<210> 211
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 211

tctggagata aattggggga taaatatgct ttc 33

35

<210> 212
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 212

catgatacca agcggccctc a 21

40

<210> 213
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Quimera Activina A/B

50

<400> 213

```

ggctctagagt gtgatggcaa ggtcaacatc tgctgtaaga aacagttctt tgtcagtttc 60
aaggacatcg gctggaatga ctggatcatt gctccctctg gctatcatgc caactactgc 120
gaggggtgagt gcccagagcca tatagcaggc acgtccgggt caagcttggtc cttccactca 180
acagtcacatc accactaccg catgcggggc catagcccct ttgccaacct caaatcatgc 240
tgtattccca ccaagctgag caccatgtcc atgttggtact ttgatgatga gtacaacatc 300
gtcaaaaggg acgttccgaa catgatogtg gaggagtgtg ggtgctcatg agcggccgct 360

```

<210> 214
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 214

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1      5      10      15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65      70      75      80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85      90      95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100      105      110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115      120      125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130      135      140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145      150      155      160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165      170      175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180      185      190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195      200      205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210      215      220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225      230      235      240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245      250      255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260      265      270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275      280      285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290      295      300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305      310      315      320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

```

<210> 215
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 215

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
	65				70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	145				150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195					200					205				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	225				230					235				240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260					265						270		
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	275					280						285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	305				310					315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				325											

<210> 216

<211> 36

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 216

10 gatcaagatt actatgatag tagtggttg gacccc

36

<210> 217

<211> 105

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 217

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

<210> 218
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 218

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

<210> 219
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 219

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Phe
 1 5 10

<210> 220
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 220

His Asp Thr Lys Arg Pro Ser 1 5

<210> 221
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 221

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 222

<211> 318

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 222

ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
 10 gccacaagg ccacactggg gtgtctcata agtgacttct acccgaggag cgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaa 240
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttca 318

<210> 223

<211> 321

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 223

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcaggggc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 224

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Trp Asp Pro
 1 5 10

<210> 225

<211> 116

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 225

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

<210> 226

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 227

<211> 636

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 227

```

tcctatgagg tgactcaggc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgtt ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactcttg aaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgccccct cggtcactct gttcccgccc 360
tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc acactggtgt gtctcataag tgactttctac 420
ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 480
accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgcgg ccagcagcta tctgagcctg 540
acgctgagc agtggaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaaggggagc 600
accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 636

```

<210> 228
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 228

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agttatgggt tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcatccctt acaatggtta cacaaactct 180
gcacagaaac tccagggcag agtcacatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga gtagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagacagg 300
gactacggtg tcaattatga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cggcctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 660
gagcgcgaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 720
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgagc ccctgaggtc 780
acgtgcgtgg tgggtgagct gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgcgaag tctccaacaa aggcctccca gcccccacg agaaaaccat ctccaaaacc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgacctgtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1200
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

```

<210> 229
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 229

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctoc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgctt gatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggtatc tgggacagaa ttcaactctca caatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg gcaatgtaca gtggaagggt gtaaacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

```

<210> 230
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 230

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180
gcagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300
aactggaact acgacaacta ctactacggt ctggacgtct gggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 420
agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaaccg 480
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgtctct accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc 600
ggcaccacaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
acagttgagc gcaaagtgtg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga 720
ccgtcagtcct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 780
gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac 900
agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc 1020
aaaaccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1140
gccgtggagt ggggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctccatg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaaagctc ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

```

<210> 231
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 231

```

gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaaacca 120
gggaaaagccc ctaagcgctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggtatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcgacag caaaaatactt acccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccacagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

```

<210> 232
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 232

```

gaggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agttatttga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg cgtggccaac ataaagcaag atggaagtga ggaatactat 180
gtggactctg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggtagc 300
agcagctggt actactacaa ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420

```

```

acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
acccagacct acacgtgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaca 660
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1020
accaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

```

<210> 233

<211> 212

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

```

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

```

10

<210> 234

<211> 448

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 234

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20     25     30

```

20

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Ser Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Asp Tyr Gly Val Asn Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 210 215 220
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 235

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn

10

[illegible]

<210> 236
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 236

Gln 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Ser	Tyr
Gly	Met	His 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
Ala	Val	Ile 50	Trp	Tyr	Asp	Gly 55	Ser	Asn	Lys	Tyr	His 60	Ala	Asp	Ser	Val
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys 75	Asn	Thr	Leu	Tyr 80
Leu	Gln	Val	Asn 85	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Val	Arg	Ser	Arg 100	Asn	Trp	Asn	Tyr	Asp 105	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Gly 110	Leu	Asp
Val	Trp	Gly 115	Gln	Gly	Thr	Thr	Val 120	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 125	Ser	Thr	Lys
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu 135	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg 140	Ser	Thr	Ser	Glu
Ser 145	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly 150	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 155	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 160
Val	Thr	Val	Ser 165	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 170	Thr	Ser	Gly	Val	His 175	Thr
Phe	Pro	Ala	Val 180	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly 185	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 190	Ser	Val
Val	Thr	Val 195	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe 200	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 205	Thr	Cys	Asn
Val	Asp 210	His	Lys	Pro	Ser	Asn 215	Thr	Lys	Val	Asp 220	Lys	Thr	Val	Glu	Arg
Lys 225	Cys	Cys	Val	Glu	Cys 230	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 235	Pro	Pro	Val	Ala	Gly 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 237
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 237

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

210
 <210> 238
 <211> 449
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 238

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20						25					30		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	
		35					40						45			
Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	
		50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asp	Val		
			100				105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
		115				120					125					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	
		130				135					140					
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				165					170					175		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
		180						185					190			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
		195					200					205				
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	
	210				215						220					
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	
225					230				235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245					250					255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
		260						265					270			
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275					280					285				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	
	290					295					300					
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
305					310					315				320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				325					330					335		
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
		340					345						350			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
		355					360					365				
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
	370					375					380					
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	
385					390					395				400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				405						410				415		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
			420					425					430			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
		435					440						445			

Lys

5

<210> 239

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 239

```

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
tggaagtgtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t

```

<210> 240

<211> 978

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 240

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcct accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaagggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaa

```

10

<210> 241

<211> 978

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 241

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcct accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaagggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaa

```

20

<210> 242

<211> 824

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 242

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgtctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccttcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttggt tgcagtgtcc accgtgtcca gcaccactg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtgggtgggt acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcc 824

```

<210> 243

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera Activina A/B

10

<400> 243

```

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

```

15 <210> 244

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Quimera Activina A/B

<400> 244

```

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

```

<210> 245

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 245

10 ctcgaggtcg actagaccac catgcccttg c 31
 <210> 246
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido

20 <400> 246
 ccatcacact ctagaccccg ccgacgcc 28
 <210> 247
 25 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Quimera Activina A/B
 <400> 247

ggtctagagt gtgatggcaa ggtcaacatc tgotgtaggc aacagttctt tatcgatttc 60
 aggctcatcg gctggaatga ctggatcatt gctccactg gctattatgg caactactgc 120
 gagggtagt gcccgagcca tatagcaggc acgtccgggt caagcttgtc cttccactca 180
 acagtcatca accactaccg catgcggggc catagcccct ttgccaacct caaatcatgc 240
 tgtgtgcca ccaagctgag acccatgtcc atgttggtact atgatgatgg tcaaaacatc 300
 atcaaaaagg acattcagaa catgatcgtg gaggagtgtg ggtgctcatg agcggccgct 360

35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste, que comprende:
 - a. un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende:
 - i. una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 11;
 - 5 ii. una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO:12; y
 - iii. una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO:13; y
 - b. un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende:
 - i. una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO:62;
 - ii. una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 63; y
 - 10 iii. una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 64,

en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste se une específicamente a activina A humana.
2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 que comprende bien:
 - a. una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9;
 - b. una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 10; o
 - 15 c. el dominio variable de cadena ligera de (a) y el dominio variable de cadena pesada de (b).
3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 que, cuando se une a activina A:
 - a. inhibe la activina A;
 - b. compite de manera cruzada con un anticuerpo de referencia para la unión a activina A;
 - 20 c. se une al mismo epítipo de la activina A que dicho anticuerpo de referencia;
 - d. se une a la activina A con sustancialmente la misma Kd que dicho anticuerpo de referencia; o
 - e. se une a la activina A con sustancialmente la misma velocidad de disociación que dicho anticuerpo de referencia;

en el que dicho anticuerpo de referencia comprende una combinación de secuencias de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada seleccionada del grupo de combinaciones que consiste en: SEQ ID NOS: 9 y 10.
- 25 4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 ó 2 que, cuando se une a activina A humana, inhibe la unión de activina A al receptor de activina A humano.
5. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste posee al menos una actividad biológica *in-vivo* seleccionada del grupo que consiste en: atenuación de la caquexia en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa muscular en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa grasa en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; y mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal con transfección de AAV-activina A.
 - 30
6. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 ó 2, que comprende un anticuerpo completamente humano aislado que se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste posee al menos una actividad biológica *in-vivo* seleccionada del grupo que consiste en: atenuación de la caquexia en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en ratones que portan tumor de colon; mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa muscular en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; mejora la pérdida de masa grasa en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno; y mejora la pérdida de peso corporal en un modelo animal con transfección de AAV-activina A.
 - 35
 - 40
7. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 ó 2, que comprende un anticuerpo completamente humano aislado que

- a) se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vitro*, o
- 5 b) se une específicamente a la región de nudo de cisteína (aminoácidos C11-S33 y/o aminoácidos C81-E111) de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vivo*, o
- c) se une específicamente a los aminoácidos K13—Y39 de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vitro*, o
- 10 d) se une específicamente a los aminoácidos V82—N107 de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vitro*, o
- e) se une específicamente a los aminoácidos K13-Y39 de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vivo*, o
- f) se une específicamente a los aminoácidos V82-N107 de activina A, en el que dicha proteína de unión a antígeno inhibe la unión de activina A al receptor de activina A *in vivo*.
- 15 8. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la secuencia constante de cadena ligera kappa de SEQ ID NO: 84, 100 ó 108, y/o la secuencia constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 214, 215 ó 221.
9. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según la reivindicación 8, que comprende la secuencia constante de cadena ligera kappa de SEQ ID NO: 84 y la secuencia constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 214.
- 20 10. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tiene una afinidad de unión (K_D) para activina A humana de menos de o igual a 1×10^{-11} M.
11. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera, cadena pesada o ambas de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 25 12. Un vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 11.
13. El vector según la reivindicación 12, que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un vector viral, vectores de mamífero no episomales, vectores de expresión y un vector de expresión recombinante.
14. Una célula aislada que comprende un polinucleótido según la reivindicación 11, o en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante según la reivindicación 13.
- 30 15. La célula aislada según la reivindicación 14, que es una célula de hibridoma o una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).
16. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 35 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 que comprende además una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante, un polipéptido de bajo peso molecular, una proteína, un aminoácido, un carbohidrato, un agente quelante, un estabilizador, y un excipiente.
18. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 ó 17 para uso en medicina.
19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, para uso en el tratamiento de una afección cancerosa.

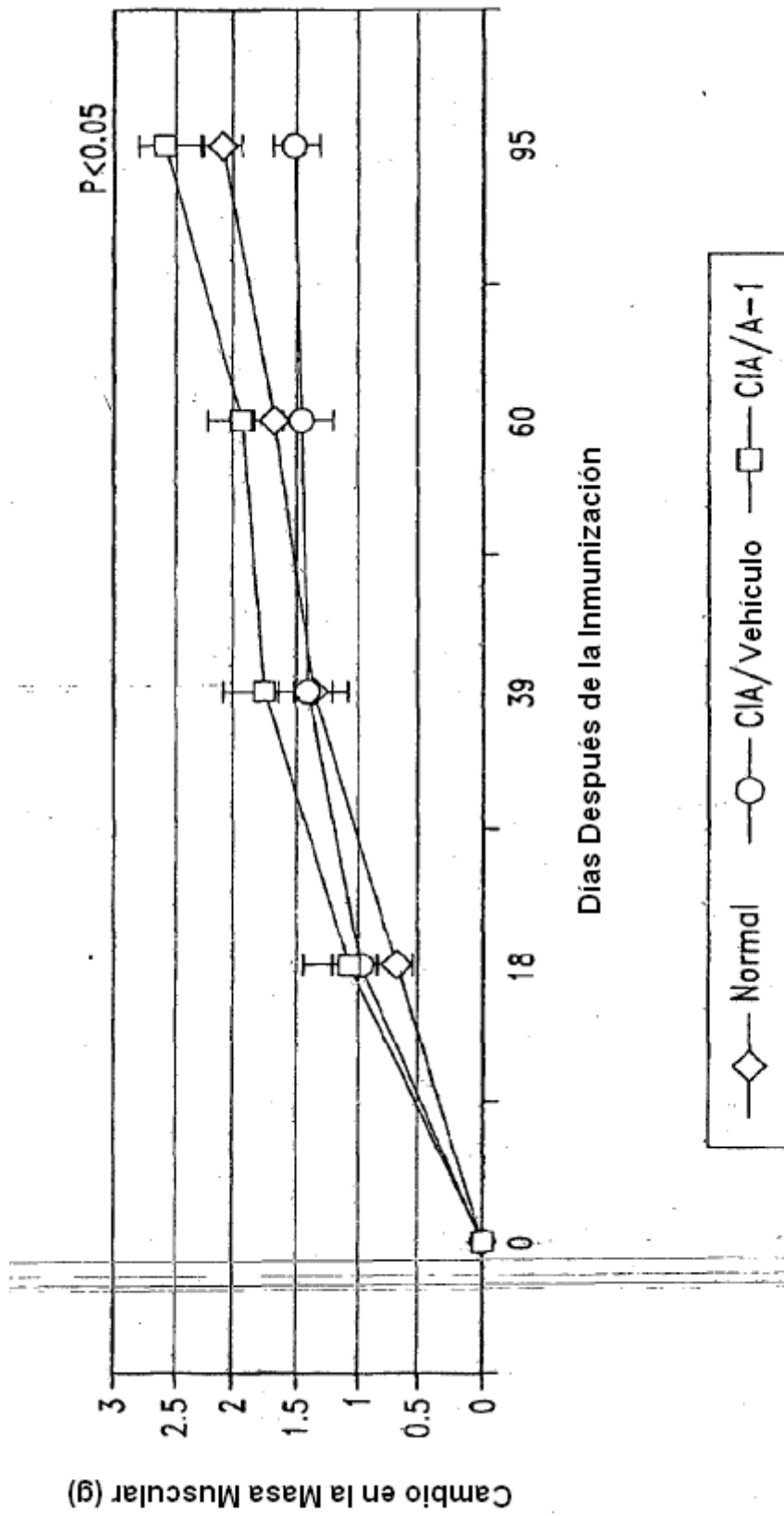


Fig. 1

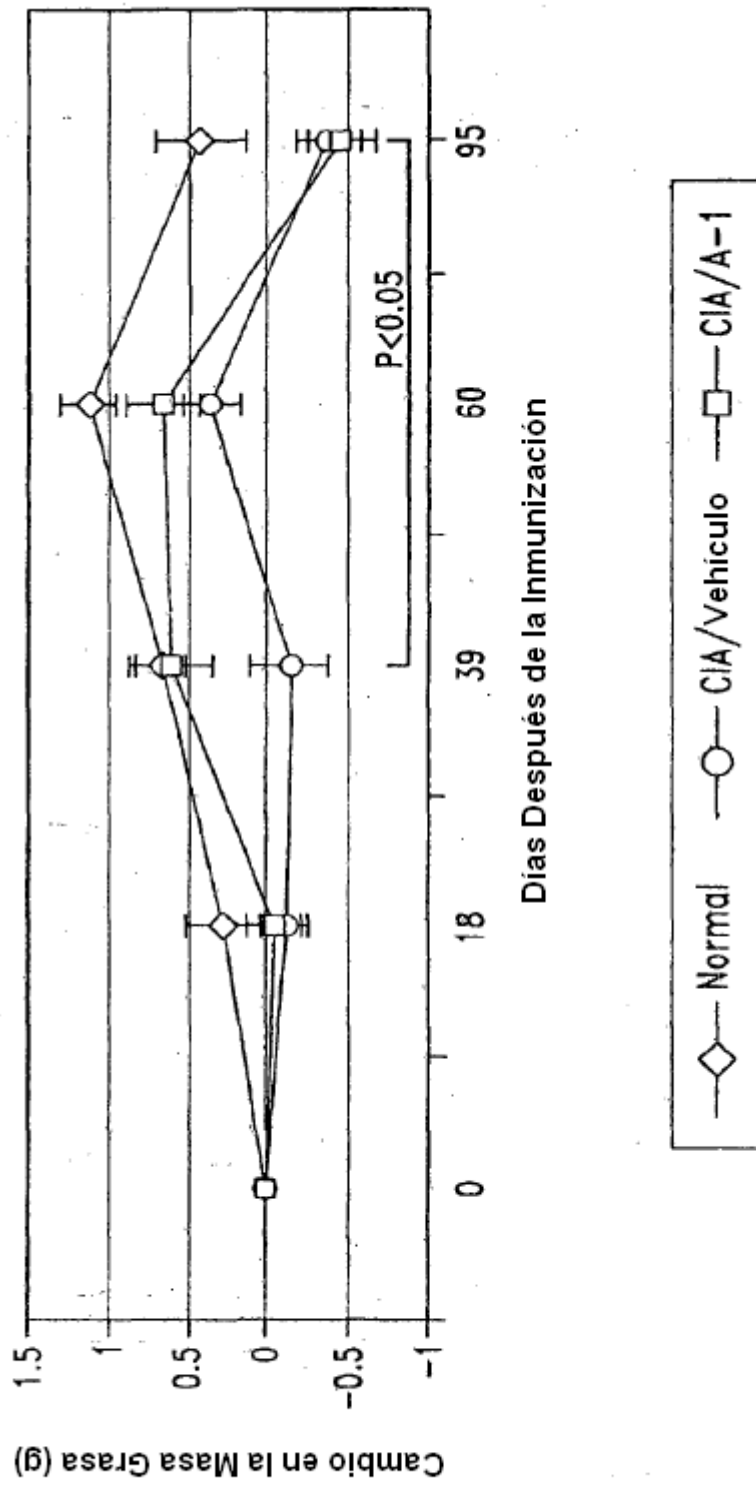


Fig. 2

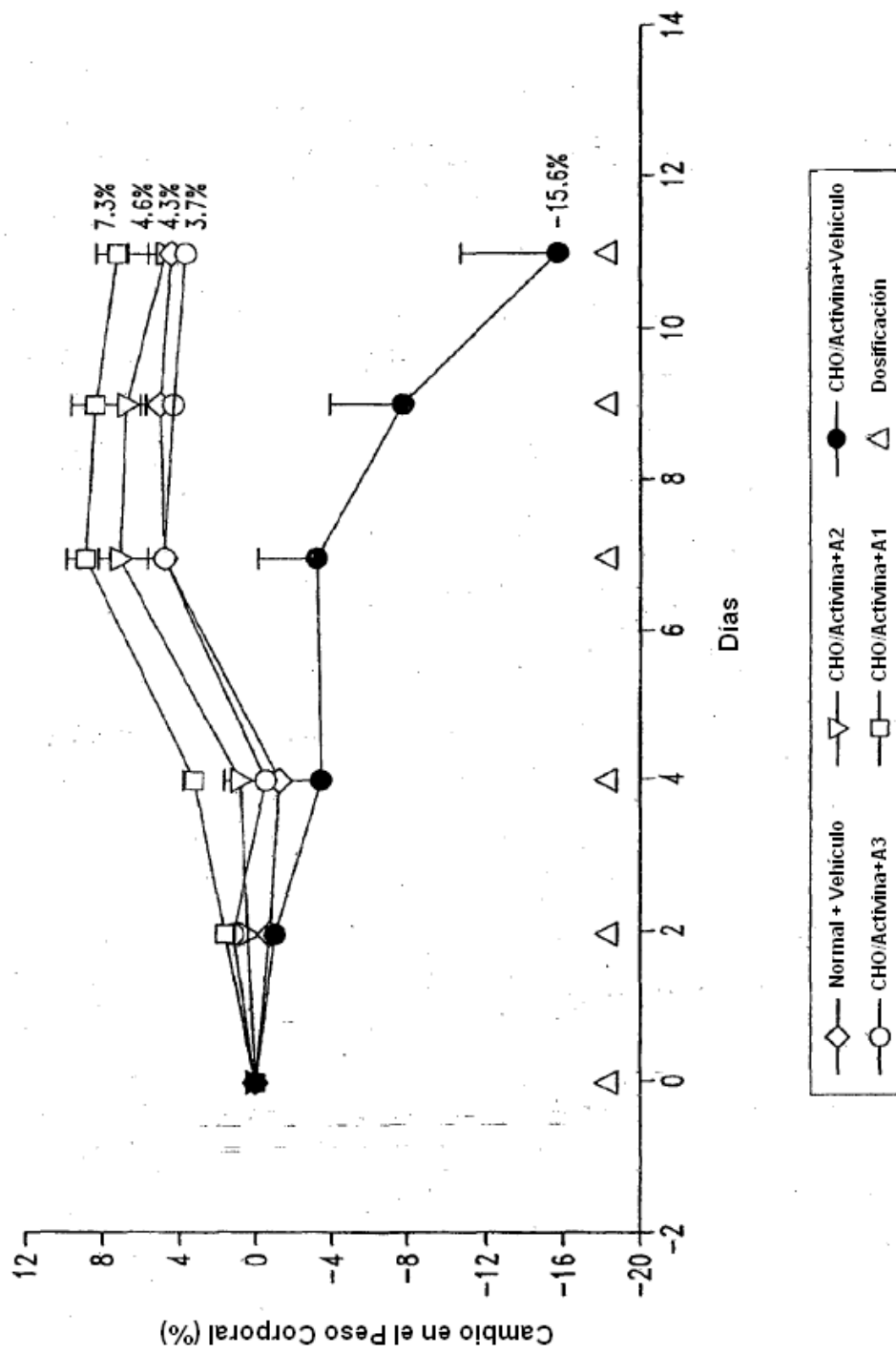


Fig. 3

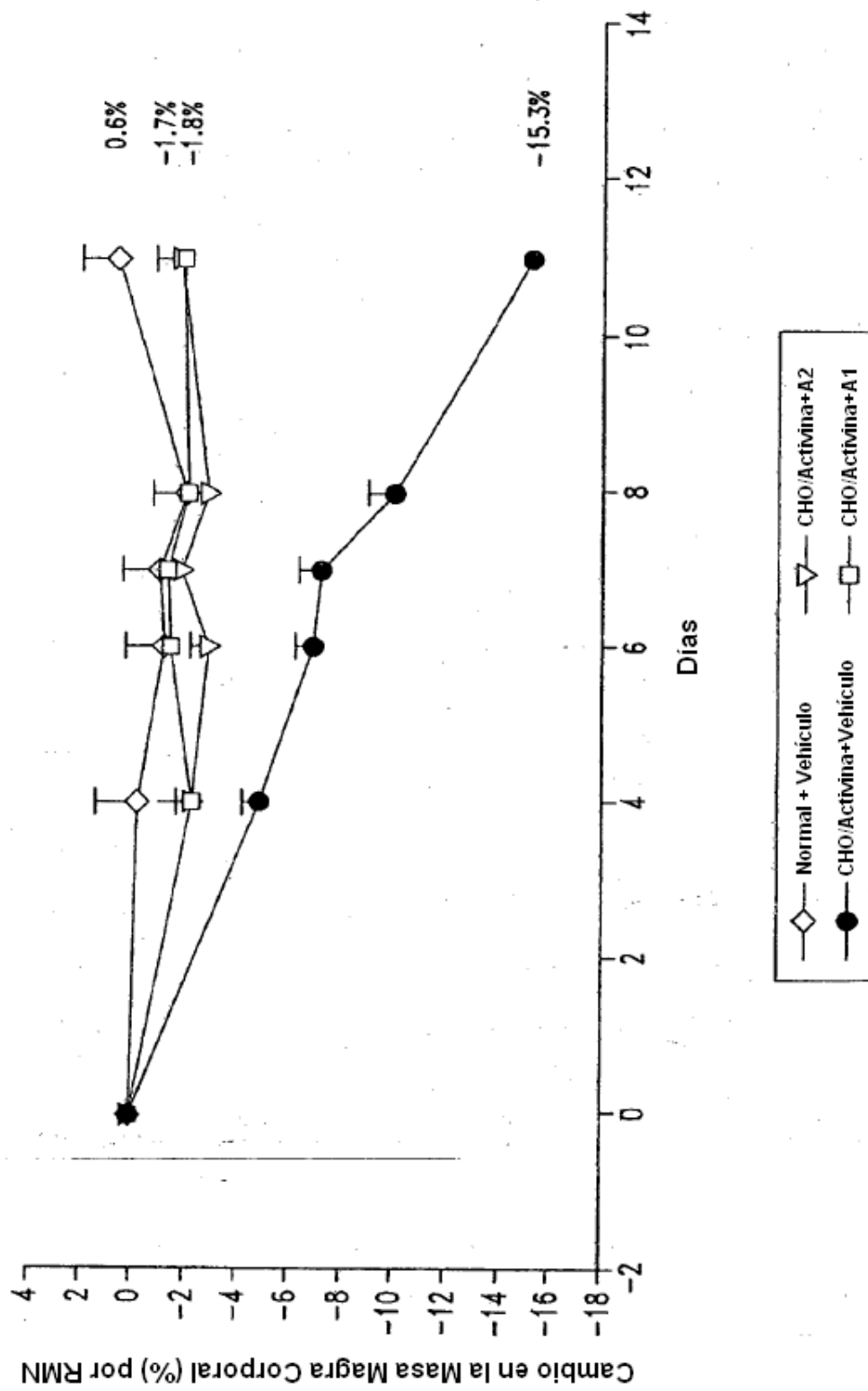


Fig. 4

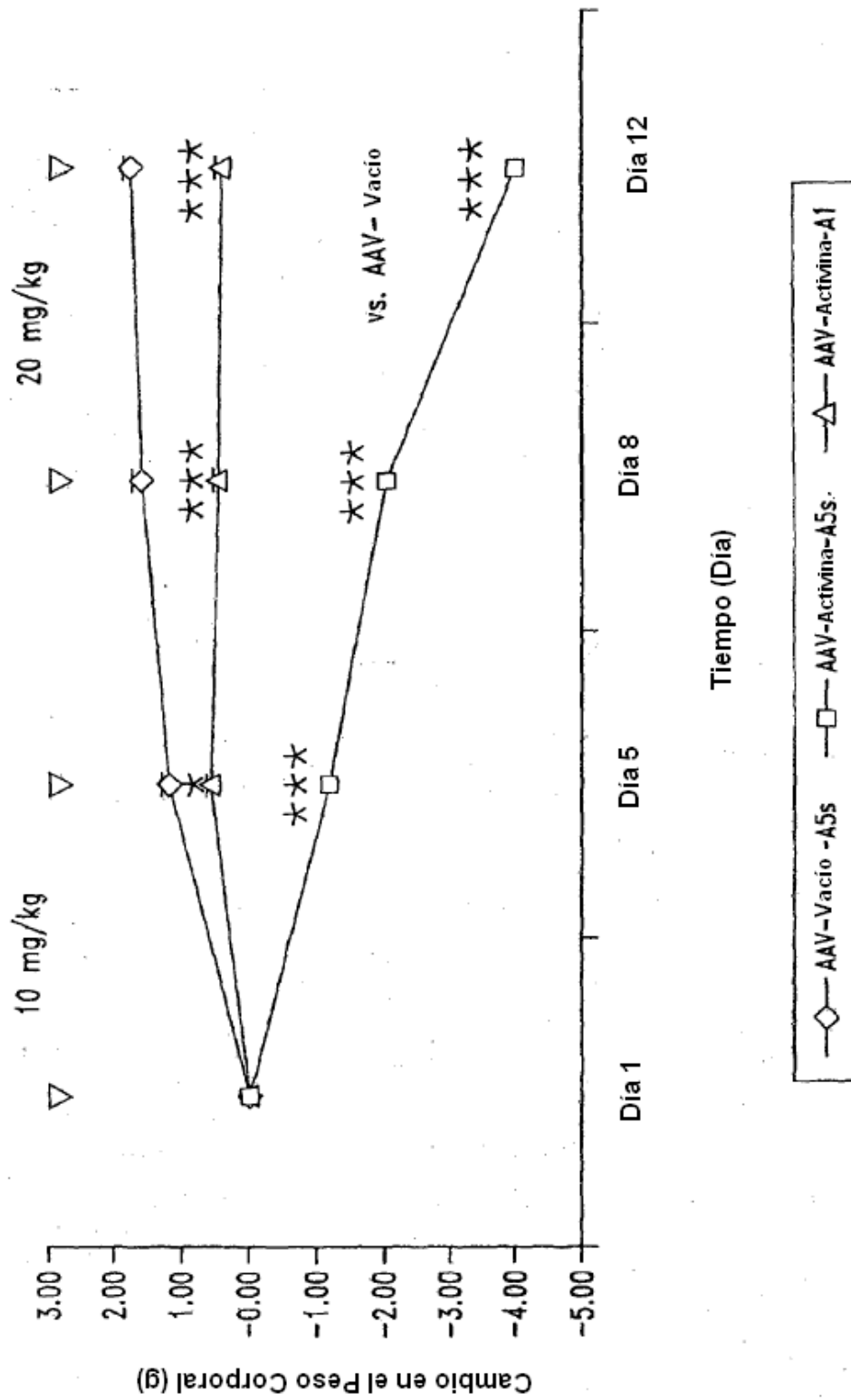


Fig. 5

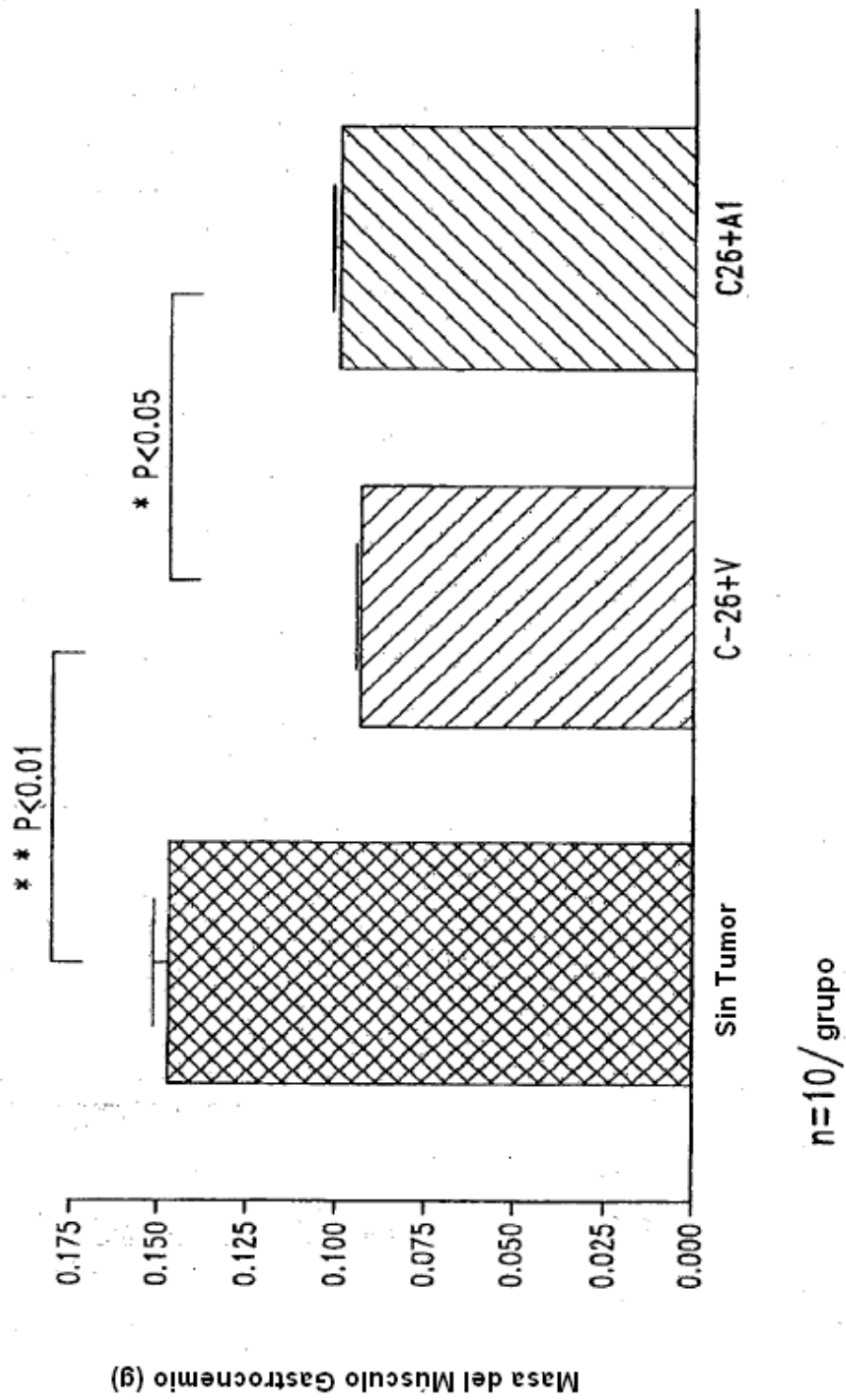


Fig. 6

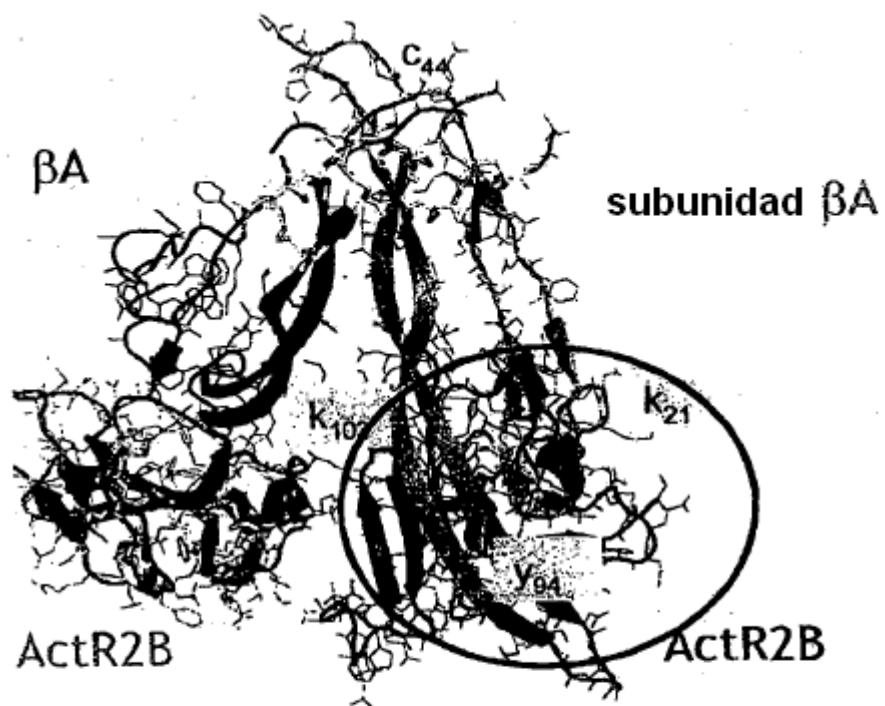
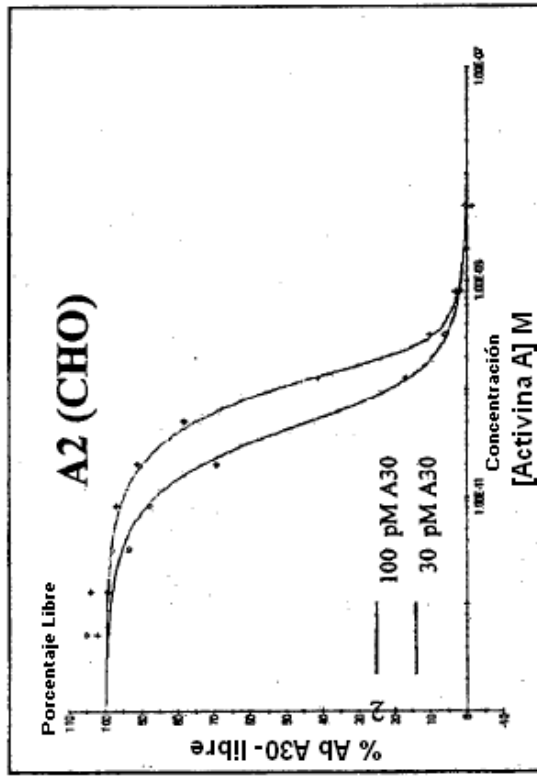
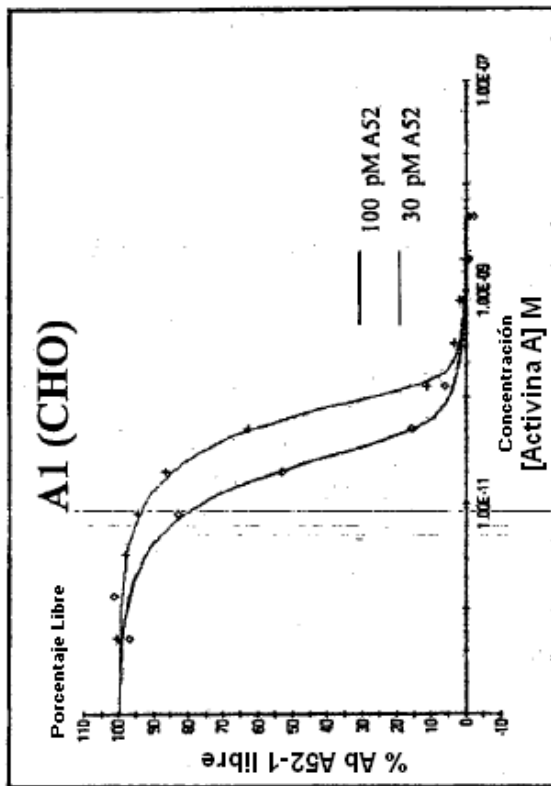


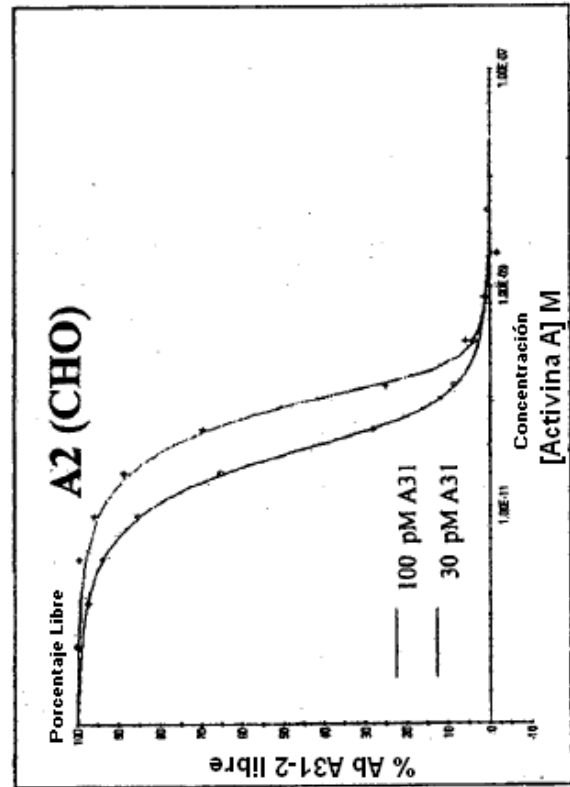
Fig. 7



B

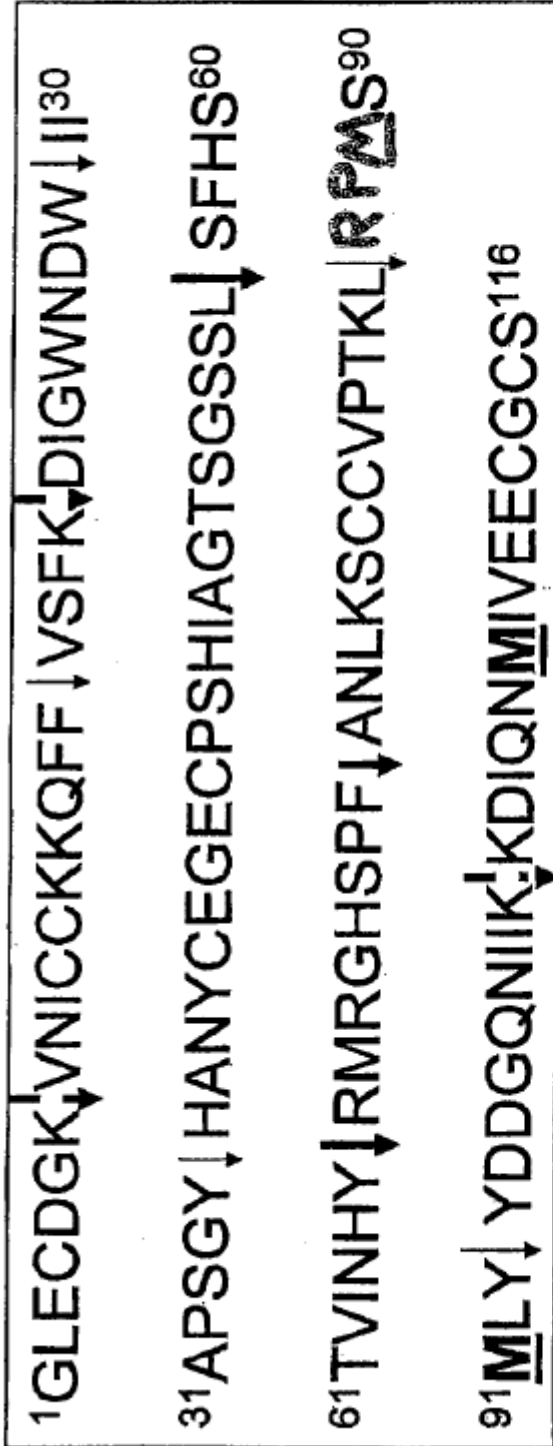


A



C

Fig. 8



Flechas continuas - escisión por quimiotripsina

Flechas rotas - escisión por LysC

M - escisión posible por CNBr

Las flechas y residuos en **negrita** no estaban protegidos por la unión del anticuerpo.

Fig. 9

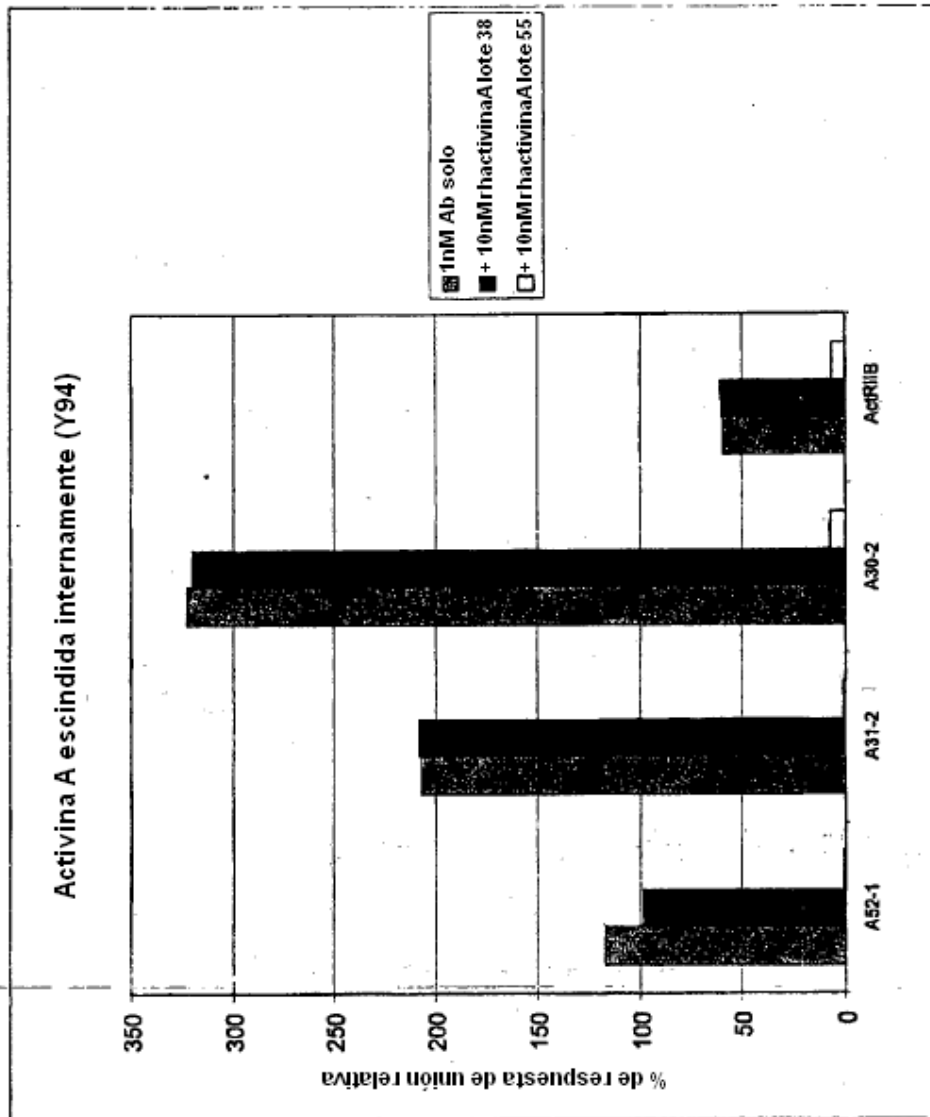
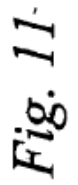
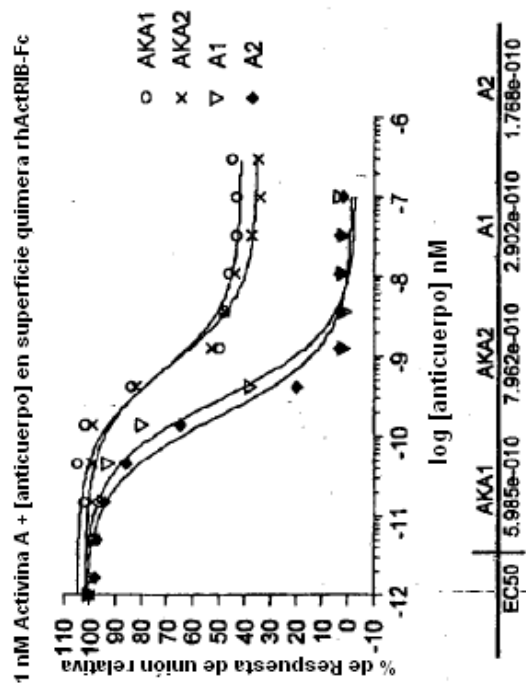
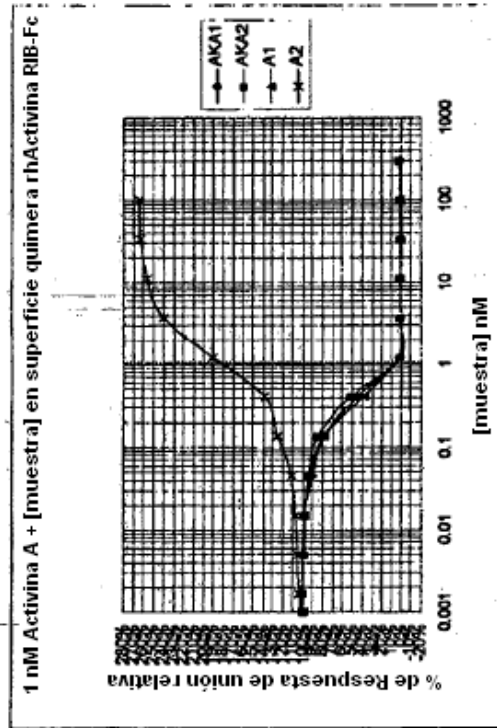


Fig. 10





A



B

Fig. 12

Quimeras Activina A/B

	(1)	1	10	20	30	40	54
Actina A 13/39 B	(1)	GLECDGKVN	ICCRQOFF	FIDFRL	IGWNDWII	APGTGY	MGNYCEGECPSHIAGTSGS
Actina A 82/107 B	(1)	GLECDGKVN	ICCRQOFF	FVDFKD	IGWNDWII	APSGYH	ANYCEGECPSHIAGTSGS
Actina A	(1)	GLECDGKVN	ICCRQOFF	FVDFKD	IGWNDWII	APSGYH	ANYCEGECPSHIAGTSGS
Sección 2							
	(55)	55	60	70	80	90	108
Actina A 13/39 B	(55)	SLSFHSTVIN	HYRMGRGHS	PFANLKS	CCVETKLR	PMSMLYYDDGQNI	KKDIQNM
Actina A 82/107 B	(55)	SLSFHSTVIN	HYRMGRGHS	PFANLKS	CCIPTKLS	TMSMLYFDDDEYN	IVKRDVPENM
Actina A	(55)	SLSFHSTVIN	HYRMGRGHS	PFANLKS	CCVETKLR	PMSMLYYDDGQNI	KKDIQNM
Sección 3							
	(109)	109	115				
Actina A 13/39 B	(109)	IVEECGCS	SEQ ID NO. 266				
Actina A 82/107 B	(109)	IVEECGCS	SEQ ID NO. 294				
Actina A	(109)	IVEECGCS	SEQ ID NO. 225				

Fig. 13

100 nM Anticuerpos bloquean la quimera Activina A/B en Superficie ActRIB-Fc

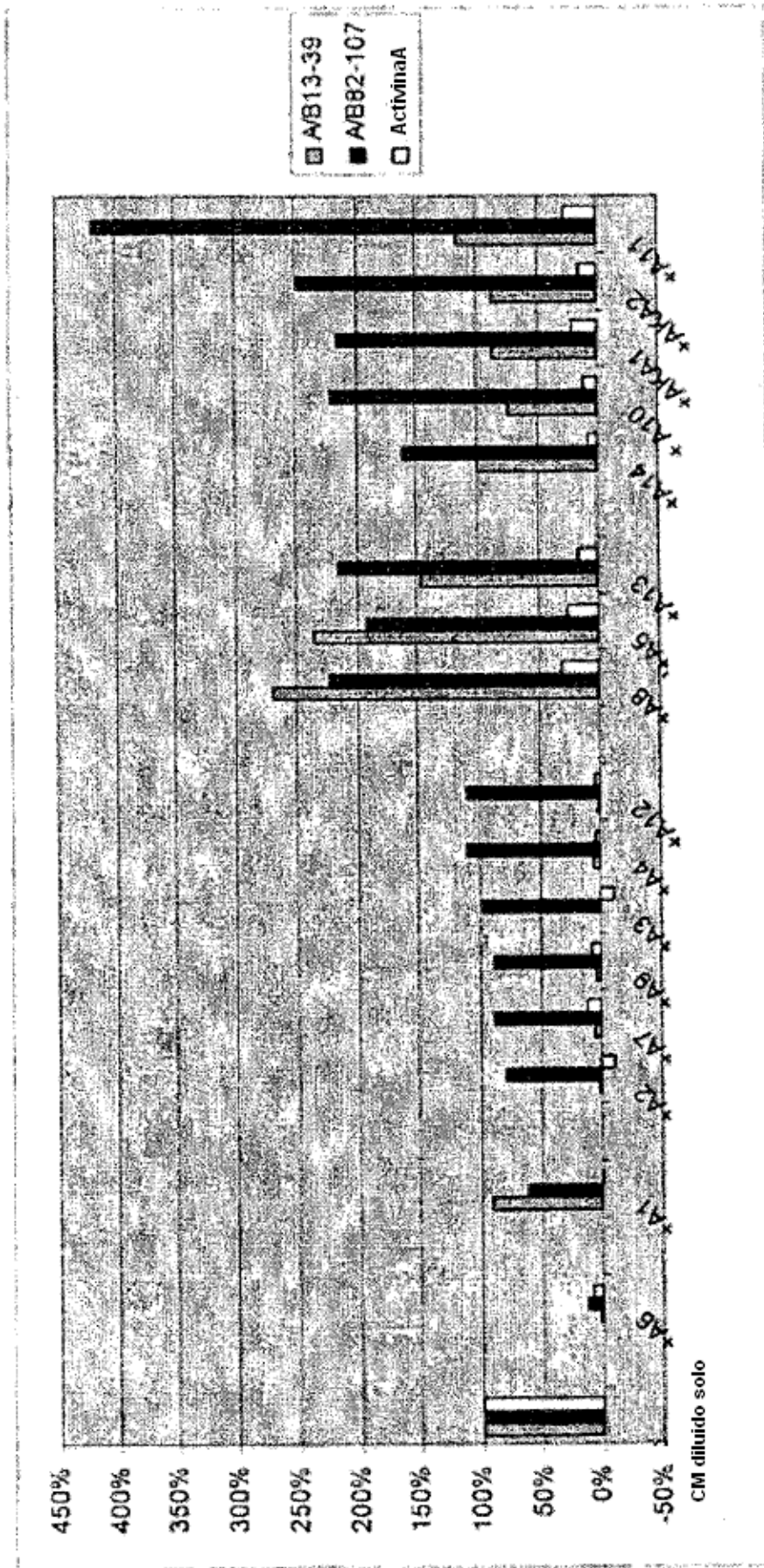


Fig. 14