

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 464**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2006 E 06816226 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1951756**

54 Título: **Anticuerpos anti-miostatina**

30 Prioridad:

06.10.2005 US 724670 P

11.10.2005 US 725235 P

12.10.2005 US 726062 P

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

10.04.2015

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

HAN, BOMIE;
KORYTKO, ANDREW;
MITCHELL, PAMELA JEAN;
SMITH, ROSAMUND CAROL;
O'BRYAN (NEE TOBIAS), LINDA y
WANG, RONG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 464 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-miostatina

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la medicina, particularmente al campo de anticuerpos monoclonales frente a la miostatina. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-miostatina humanizados de alta afinidad que unen preferentemente miostatina a GDF-11 y al uso de los anticuerpos para terapia, profilaxis o diagnóstico de diversos trastornos o afecciones en especies de mamíferos y aves.

Antecedentes de la invención

10 En el desarrollo embrionario y en la homeostasis del tejido adulto están implicados miembros de la superfamilia de proteínas del factor beta de crecimiento transformante (TGF- β). Los miembros de la superfamilia de TGF- β comparten una estructura común que incluye una secuencia señal de péptido necesaria para la secreción de la proteína y un fragmento amino-terminal que se escinde de forma proteolítica aproximadamente 105-140 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína precursora grande para producir la proteína madura. La proteína madura se caracteriza por restos de cisteína altamente conservados, mientras que la forma activa de la proteína madura es un homodímero unido por disulfuro de la proproteína escindida de forma proteolítica (Gray, A., y Maston, A., Science, 247: 1328, 1990).

15 La miostatina, también conocida como factor 8 de diferenciación de crecimiento (GDF-8), es un miembro de la superfamilia de TGF- β de proteínas. La miostatina comparte similitudes estructurales con otros miembros de la familia de TGF- β . Contiene un extremo amino hidrófobo que actúa como una señal de secreción y un dominio RSRR conservado que es importante para el procesamiento proteolítico. La escisión de la proteína da lugar a un péptido asociado a la latencia amino-terminal y un péptido de señalización maduro carboxi-terminal que forma el homodímero biológicamente activo. La miostatina se expresa en gran medida en el desarrollo y músculo esquelético adulto y funciona como un regulador negativo del músculo esquelético. La sobreexpresión sistémica de la miostatina en ratones adultos conduce a la pérdida de masa muscular (Zimmers, y col., Science, 296: 1486-1488, 2002) mientras que por el contrario, un ratón genosuprimido para miostatina se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético dando como resultado una masa muscular de dos a tres veces mayor que sus compañeros de camada de tipo silvestre y una disminución en la acumulación de grasa (McPherron, y col. Nature, 387: 83-90, 1997). Se informó que un ser humano con una mutación de genosupresión de miostatina tenía asociada hipertrofia muscular total (Scheulke, y col., New Eng. J. Med. 350: 2682, 2004).

20 En la actualidad existen tratamientos limitados disponibles para la atrofia muscular o para trastornos o afecciones que se beneficiarían de un aumento de masa muscular y/o fuerza muscular que incluyen, por ejemplo, distrofia muscular, debilidad, atrofia por desuso y, caquexia, así como trastornos que están asociados con la atrofia muscular, por ejemplo, enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad cardíaca, y enfermedad hepática. Debido a su papel como un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético, la miostatina es un objetivo deseable para la intervención terapéutica o profiláctica para tales trastornos o afecciones o para el control de la progresión de estos trastornos o afecciones. Aparte de su papel directo en la regulación del músculo esquelético, la miostatina también puede estar implicada en otros procesos fisiológicos que incluyen la diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Kim y col. BBRC, 281: 902-906, 2001), e, indirectamente, con la homeostasis de la glucosa (McPherron, A y Lee S-J. JCI 109: 595, 2002) e inhibición de la formación de hueso (Hamrick, M. Mol. Cell Evol. Biol. 272 388-91, 2003; Hamrick y col. Calcif Tissue Int. 71: 63, 2002). Por lo tanto, los antagonistas específicos de miostatina, por ejemplo, anticuerpos específicos de miostatina, también pueden resultar útiles para tratar, prevenir o controlar trastornos o afecciones tales como los que se benefician del aumento de la densidad ósea (por ejemplo, osteoporosis), diabetes de Tipo II, síndrome metabólico, obesidad y osteoartritis.

25 La miostatina está altamente conservada a través de las especies; la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la miostatina en seres humanos, ratón, rata, pollo, pavo y vaca es idéntica en un 100 % (véanse las Figs. 2 y 3). Existen mutaciones miostatina de origen natural en el ganado, que se han relacionado con un fenotipo de doble musculatura (McPherron, y col. PNAS, 94: 12457-61, 1997). Dado que la miostatina está altamente conservada en secuencia y en función a través de las especies, un anticuerpo anti-miostatina no solamente proporciona un medio prometedor para aumentar la masa muscular, o tratamiento o prevención de tales trastornos o afecciones mencionados anteriormente en seres humanos, sino también en otros mamíferos que incluyen, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, caninos y felinos), animales deportivos (por ejemplo, equinos), animales fuente de alimentos (por ejemplo, bovinos, porcinos y ovinos) y en especies aviares (por ejemplo, pollo, pavo, pato y otras aves de caza y aves de corral).

30 El factor 11 de diferenciación de crecimiento, también denominado GDF-11 o BMP-11, es el miembro de la superfamilia de TGF- β de proteínas que es el más homólogo a la miostatina. Las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de la miostatina humana y GDF-11 son idénticas en aproximadamente un 90 %; sin embargo, el GDF-11 se expresa en una variedad de tejidos más amplia que el GDF-8 incluyendo pulpa dental, cerebro, corazón, riñón y pulmón así como tejido muscular y adiposo (Nakashima, y col. Mech. of Development 80: 185, 1999). Los

ratones genosuprimido para GDF-11 mueren a las 24 horas del nacimiento con múltiples anomalías. En particular, los ratones presentan pares extra de costillas, falta de riñones y muestran defectos en el estómago, bazo y páncreas (McPherron y col., Nature Genetics 22: 260, 1999; Esquela y Lee, Dev. Biol. 257: 356, 2003; Harmon y col., Devpt. 131: 6163, 2004). Recientemente se ha encontrado que el GDF-11 gobierna las ventanas temporales durante las que los progenitores multipotentes mantienen la competencia para producir distinta progenie neuronal (Kim, J. y col. Science 308: 1927-1930, 2005).

Existe una necesidad terapéutica de inhibir específicamente una actividad de miostatina aunque sin inhibir, o inhibir de forma mínima, una actividad de otras proteínas de la superfamilia de TGF- β , en particular GDF-11, para minimizar la posibilidad de efectos secundarios indeseables resultantes de unión del antagonista de miostatina a otra proteína de la superfamilia de TGF- β . Además, existe una necesidad de diagnóstico para un anticuerpo anti-miostatina que no reaccione de forma cruzada, o que reaccione mínimamente de forma cruzada, con otra proteína de la superfamilia de TGF- β , en particular GDF-11, para controlar con mayor precisión o para determinar los niveles de miostatina en una muestra. Además, existe una necesidad de anticuerpos específicos para miostatina que se unan específica y preferentemente a la miostatina con una alta afinidad y que permitan de ese modo que el nivel de dosis que los pacientes reciben se minimice de ese modo lo que puede dar como resultado una dosificación menos frecuente con un anticuerpo de ese tipo que con un anticuerpo que se une a la miostatina con una afinidad menor (es decir, una K_D más elevada). También se desea un anticuerpo de alta afinidad porque puede permitir una mayor flexibilidad en la vía de administración del anticuerpo a un paciente ya que es menos deseable que un fármaco se administre por vía intravenosa que por vía subcutánea, por ejemplo. También existe una necesidad de anticuerpos específicos de miostatina con un valor de CI_{50} bajo o de otro modo favorable en un ensayo de bioactividad de miostatina con el fin de generar un anticuerpo anti-miostatina terapéutico con una dosis terapéutica eficaz mínima. También se desea proporcionar anticuerpos específicos para miostatina en los que cualquier respuesta inmune al anticuerpo evocada por un paciente que recibe el anticuerpo se reduce a un mínimo. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales anti-miostatina humanizados, y porciones de unión a antígeno de los mismos, que antagonizan o neutralizan al menos una actividad o propiedad biológica *in vitro* o *in vivo* asociada con la miostatina o una porción de la misma.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo anti-miostatina humanizado que comprende un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 10 y un polipéptido de la región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 26.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo anti-miostatina humanizado que comprende un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 5 y un polipéptido de la región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 15.

Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para uso como un medicamento. Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención es para uso en el tratamiento o prevención de una o más afecciones seleccionadas entre debilidad, caquexia, atrofia muscular, debilidad muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, EPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, diabetes de tipo II o síndrome metabólico.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, los anticuerpos de la invención que se unen específica y/o preferentemente a la miostatina son significativamente menos reactivos con GDF-11 que con miostatina, es decir, un anticuerpo monoclonal de la invención se une a la miostatina con una frecuencia de aproximadamente 5, 10, 20, 22, 24, o 25 veces mayor que la de unión a GDF-11 tal como se mide con una técnica disponible en la técnica por ejemplo, mediante ELISA de competición, o mediante ensayo de BIACORE o KINEXA para demostrar la afinidad más elevada (es decir, K_D inferior) del anticuerpo hacia GDF-8 que hacia GDF-11. Lo más preferentemente, los anticuerpos de la invención, cuando se expresan como Fabs, no se unen a GDF-11 en niveles superiores a los del fondo en ningún ensayo de unión disponible en la técnica. Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a la miostatina dentro del dominio que abarca los aminoácidos 40-64 [ANYCSGCEFEVFLQKYPHTLVHQA para el ser humano], 43-57 [CSGCEFEVFLQKYPH O CSGESEFEVFLQKYPH para el ser humano] y/o 45-59 [GECEFEVFLQKYPHTH para el ser humano] de la miostatina madura o se unen específicamente a un polipéptido que consiste en los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o aminoácidos 45-59 de la miostatina madura.

En una realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una afinidad de unión fuerte (K_D) hacia la miostatina, es decir, inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M, preferentemente inferior a aproximadamente 9×10^{-10} M, $8,7 \times 10^{-10}$ M o lo más preferentemente, inferior a aproximadamente 8×10^{-11} M. Como alternativa, los anticuerpos de

la invención se caracterizan por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente 1×10^{-9} M o 9×10^{-10} M, más preferentemente no superior a aproximadamente $8,7 \times 10^{-10}$ M y lo más preferentemente no superior a aproximadamente 8×10^{-11} M. Preferentemente, los anticuerpos de la invención que se caracterizan por una afinidad de unión fuerte tal como se ha descrito anteriormente también tienen una CI_{50} inferior a 25 nM, 20 nM, 16 nM, 14 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, o 5,2 nM en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* y/o son significativamente menos reactivos con GDF-11 que con GDF-8. Éstos se unen a la miostatina dentro del dominio que abarca los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura y/o se unen a un polipéptido que consiste en los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera ("LCVR") con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 5-12. En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un polipéptido de región variable de cadena pesada ("HCVR") con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 13-26, 55 y 56. Las secuencias asociadas con cada Número de SEC ID se muestran en las Figuras 5-9 en el presente documento.

Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD humana (o básicamente de origen humano), preferentemente IgG₁ o IgG₄. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender adicionalmente una región constante de cadena ligera kappa o lambda humana. Cuando el anticuerpo se va a usar como un agente terapéutico en un ser humano, la región constante preferentemente es básicamente de origen humano. Cuando el anticuerpo se va a usar como un agente terapéutico en un animal no humano, un huevo de un animal no humano, la región constante preferentemente se origina básicamente a partir del animal en el que es el anticuerpo se va a usar como un agente terapéutico (véase, por ejemplo, Clarkson, C. y *col.*, Mol. Imm. 30: 1195-1204, 1993; Solicitud de Estados Unidos número 2002/01651350; y números de registro en Genbank X69797, U03778, X16701, X07174, AB016711).

En el presente documento se contemplan diversas formas del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender o consiste en un anticuerpo intacto (es decir, longitud completa, que tiene una región Fc intacta), un anticuerpo básicamente intacto, una porción de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂) o un fragmento Fv de una sola cadena. Se entiende que todas estas formas de los anticuerpos se incluyen en el presente documento y a través del mismo con el término "anticuerpo". Además, un anticuerpo de la invención se puede marcar con una marca detectable, inmovilizar en una fase sólida y/o conjugar con un compuesto heterólogo, por ejemplo, una molécula de enzima o polietilenglicol. Además, se contempla que los anticuerpos de la invención son "monoclonales" incluso aunque puedan diferir en el patrón de glicosilación.

En el presente documento se contemplan usos de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos para los anticuerpos monoclonales de la invención. En una aplicación de diagnóstico, la invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia y/o cantidad de proteína miostatina que comprende exponer una muestra de ensayo que se sospecha que contiene la proteína miostatina a un anticuerpo anti-miostatina de la invención y determinar la unión específica del anticuerpo a la muestra. Un anticuerpo anti-miostatina de la invención se puede usar para determinar los niveles de miostatina en las muestras de ensayo por comparación de los valores de la muestra de ensayo con una curva estándar generada mediante la unión de dicho anticuerpo a muestras con cantidades conocidas de miostatina usando cualquier procedimiento disponible en la técnica, por ejemplo, un ensayo de ELISA. La invención también proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención y, preferentemente, instrucciones para uso del anticuerpo para detectar la proteína miostatina por ejemplo, en una muestra de ensayo.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En dicha composición farmacéutica, el anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención es el principio activo. Preferentemente la composición farmacéutica comprende una población homogénea o básicamente homogénea de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. La composición para uso terapéutico es estéril y se puede liofilizar, preferentemente proporcionada con un diluyente apropiado.

La invención proporciona un procedimiento para inhibir al menos una actividad biológica de miostatina en un animal, preferentemente un mamífero o especie aviar, preferentemente un ser humano, con necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz, o cantidad profilácticamente eficaz, o cantidad que neutraliza la miostatina o que inhibe la miostatina de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención a dicho mamífero o especie aviar. La invención también proporciona un procedimiento para aumentar la masa muscular o para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno o afección mejorado por neutralización o antagonismo de una bioactividad de miostatina que comprende la administración a un paciente (por ejemplo, un ser humano) con necesidad de tal tratamiento o prevención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal de la invención.

La invención engloba un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención para uso en la preparación de un medicamento para la administración a un mamífero, preferentemente un ser humano, para el tratamiento, por

ejemplo, de debilidad, caquexia, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia o debilidad muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, obesidad, EPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, síndrome metabólico y diabetes de Tipo II en un mamífero, preferentemente un ser humano, con necesidad del mismo mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención.

La invención engloba un artículo de fabricación que comprende un material de envase y un anticuerpo de la invención contenido en dicho material de envase y en el que el material de envase comprende un prospecto que indica preferentemente que el anticuerpo neutraliza o antagoniza específicamente una actividad de miostatina o disminuye el nivel de miostatina. Opcionalmente, el prospecto indica adicionalmente que el anticuerpo neutraliza o antagoniza preferentemente una actividad de miostatina con respecto a una actividad de GDF-11 o disminuye preferentemente nivel de miostatina con respecto a la disminución del nivel de GDF-11 mediante la unión preferentemente de la miostatina con respecto a la unión de GDF-11.

La invención proporciona adicionalmente ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo de la invención; un vector (o vectores) que comprenden ese ácido nucleico, que se une opcionalmente de forma operativa a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped que comprende ese vector; un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención que comprende el cultivo de la célula huésped de modo que el ácido nucleico se expresa y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del medio de la célula huésped.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de promiostatina humana con la secuencia de señal subrayada y la porción de la proteína en el extremo carboxi que forma un monómero de la forma madura de miostatina con letra en negrita.

La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la miostatina madura humana monomérica. La miostatina humana activa es un homodímero de este polipéptido asociado mediante enlaces disulfuro. El epítipo antigénico de la presente invención está subrayado. Esta secuencia es idéntica a la de la miostatina madura en ratón, rata, pollo, pavo, perro, caballo, y cerdo.

La FIG. 3 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la miostatina madura de diversas especies de mamífero y aviar.

La FIG. 4 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la miostatina humana y GDF-11 humano con el epítipo antigénico de la presente invención subrayado y los restos dentro del epítipo antigénico que difieren entre miostatina y GDF-11 con letra en negrita.

La FIG. 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las HCVR con un marco conservado VH2-70. Los dominios de CDR se muestran con letra en negrita.

La FIG. 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las HCVR con un marco conservado VH4-39. Los dominios de CDR se muestran con letra en negrita.

Las FIGS. 7 y 8 muestran la alineación de la secuencia de aminoácidos de las LCVR con un marco conservado O2. Los dominios de CDR se muestran con letra en negrita.

La FIG. 9 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR de la LCVR y HCVR de diversos anticuerpos de la invención.

La FIG. 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la LCVR de diversos anticuerpos anti-miostatina de murino, cualquiera de los cuales puede ser una molécula precursora a modo de ejemplo para los anticuerpos de la invención. Véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 60/559.621 y N° 60/555.456 que se incorporan en el presente documento.

La FIG. 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la HCVR de diversos anticuerpos anti-miostatina de murino. Véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 60/559.621 y N° 60/555.456.

Descripción detallada de la invención

La invención presenta anticuerpos monoclonales anti-miostatina capaces de unirse de forma específica a miostatina de mamífero o aviar (proproteína o proteína madura o una porción de la misma; monomérica o homodimérica), en la que los anticuerpos se caracterizan adicionalmente por que son anticuerpos humanizados o porciones de unión a antígeno de los mismos capaces de neutralizar o antagonizar al menos una actividad de miostatina *in vitro* y/o *in vivo*; preferentemente demostrando una CI_{50} inferior a aproximadamente 25 nM, 20 nM, 16 nM, 14 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, o 5,2 nM en un ensayo de indicador de miostatina/SBE y/o preferentemente demostrando una afinidad de unión elevada con la miostatina. Los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente por que se unen a la miostatina dentro del dominio que abarca los aminoácidos en los restos 40-64 de la forma madura de la miostatina (por ejemplo, SEC ID N°: 53) y son significativamente menos reactivos con el homólogo más cercano de la miostatina, GDF-11.

Definiciones

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "miostatina madura" (véase la SEC ID N°: 2 para especies humanas, murina, rata, pollo, pavo, canina, equina y porcina) se refiere a la forma monomérica o la forma

homodimérica de la proteína que resulta después de la escisión proteolítica en Arg 266 de la forma de proproteína del aminoácido 375 de la miostatina. Cuando se usa en el presente documento, el término "miostatina" se refiere a miostatina madura. Cuando usan el presente documento, el término "promiostatina" o "forma de proproteína de miostatina" cuando se usa con referencia a la proteína humana se refiere a una proteína que comprende la secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 1 como un monómero u homodímero.

Un anticuerpo de longitud completa tal como existe de forma natural es una molécula de inmunoglobulina formada por cuatro cadenas de péptidos, dos cadenas pesadas (H) (de aproximadamente 50-70 kDa cuando tienen longitud total) y dos cadenas ligeras (L) (de aproximadamente 25 kDa cuando tienen longitud total) interconectadas mediante enlaces disulfuro. La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante en particular tal como se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos) por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante en particular conocida en la técnica. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada N-terminal (en el presente documento "HCVR") y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios (CH1, CH2, y CH3) para IgG, IgD, e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3, y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (en el presente documento "LCVR") y una región constante de cadena ligera, CL. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones que determinan la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco conservado (FR). Cada HCVR y LCVR está formada por tres CDR y cuatro FR, colocadas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En el presente documento, las 3 CDR de la cadena pesada se denominan "CDRH1, CDRH2, y CDRH3" y las 3 CDR de la cadena ligera se denominan "CDRL1, CDRL2 y CDRL3". Las CDR contienen la mayor parte de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas [por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) o el esquema de numeración de Chotia tal como se describe en Al-Lazikani y col., J. Mol. Biol. 273: 927-948, 1997, véase también el sitio de internet <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs>. La capacidad funcional de un anticuerpo para unirse a un antígeno en particular está muy influenciada por las seis CDR.

El término "anticuerpo" por referencia a un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención (o simplemente, "anticuerpo monoclonal de la invención"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano, a menos que se indique de otro modo en el presente documento. Preferentemente un anticuerpo monoclonal de la invención existe en una población homogénea o básicamente homogénea. Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir usando por ejemplo, técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, tales como tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, tecnologías de síntesis o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que tiene su origen en una sola copia o clon, que incluye por ejemplo, cualquier clone eucariota, procariota, o fago, y no el procedimiento con el que se produce. Un "anticuerpo monoclonal" puede ser un anticuerpo intacto (que comprende una región de Fc completa o de longitud completa), un anticuerpo básicamente intacto, o una porción o fragmento de un anticuerpo que comprende una porción de unión a antígeno, por ejemplo, un fragmento de Fab, un fragmento de Fab' o un fragmento de F(ab')₂ de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Las regiones variables de cada parte cadenas ligera/pesada forman los sitios de unión a antígeno del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo de IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la "porción de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere indistintamente en el presente documento a esa porción de una molécula de anticuerpo, dentro de la región variable, que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad hacia el antígeno. La porción de unión a antígeno del anticuerpo incluye restos de aminoácidos del marco conservado necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno. Preferentemente, las CDR de la región de unión a antígeno, o toda la región de unión a antígeno, de los anticuerpos de la invención serán de origen murino o básicamente de origen murino con determinados restos de aminoácidos alterados para mejorar una actividad en particular (véase por ejemplo, Fig. 9). Las regiones del marco conservado de anticuerpos de la invención son de origen humano o básicamente de origen humano (al menos de origen humano en un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 % o un 99 %).

Además, un "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento puede ser un fragmento de Fv de cadena individual que se puede producir mediante la unión del ADN que codifica la LCVR y la HCVR con una

secuencia conectora. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315, 1994). Se entiende que independientemente de si se especifican fragmentos o porciones, el término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye tales fragmentos o porciones así como formas de cadena individual. Siempre y cuando la proteína mantenga la capacidad de unirse de forma específica o preferentemente a su diana pretendida (es decir, epítipo o antígeno), se incluye dentro del término "anticuerpo".

Una "población de anticuerpos monoclonales", se refiere a una población de anticuerpos homogéneos o básicamente homogéneos (es decir, al menos aproximadamente un 85 %, un 87 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 97 % o un 98 % o lo más preferentemente al menos un 99 % de los anticuerpos en la población competirían en un ensayo de ELISA por el mismo antígeno o epítipo). Los anticuerpos pueden estar o no glicosilados y aún entran dentro de los límites de la invención. Los anticuerpos monoclonales pueden ser homogéneos si tienen secuencias de aminoácidos idénticas aunque pueden diferir en una modificación posterior a la traducción, por ejemplo, patrón de glicosilación.

Una "variante" de anticuerpo anti-miostatina, se refiere en el presente documento una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos a partir de un anticuerpo anti-miostatina "precursor" en virtud de la adición, supresión y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de anticuerpo precursor. En la realización precedente, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de CDR del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una (por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco) sustituciones en una o más regiones de CDR del anticuerpo precursor. La identidad o la homología con respecto a la secuencia variante se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia variante que son idénticos con los restos de anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones N-terminal, C-terminal, o interna, en la secuencia de anticuerpos afecta a la identidad u homología de la secuencia. La variante mantiene la capacidad de unirse a la miostatina y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, CI_{50} menor en un ensayo de SBE/indicador o aumento de la capacidad para inhibir una bioactividad de miostatina. La variante de anticuerpo de interés en particular en el presente documento es una que presenta al menos aproximadamente un aumento de la actividad biológica de al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, y más preferentemente al menos aproximadamente 20, 30, o 50 veces cuando se compara con el anticuerpo precursor.

El anticuerpo "precursor" en el presente documento es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. El anticuerpo precursor puede tener un marco conservado murino pero preferentemente tiene una región marco conservada humana. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo murino (véanse por ejemplo, las Figs 10 y 11 en el presente documento), quimérico, humanizado o humano.

La expresión "se une de forma específica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no se une de forma significativa a moléculas distintas de su o sus compañeros de unión específicos (es decir, reactividad cruzada inferior a aproximadamente un 35 %, un 33 %, un 30 %, un 20 %, o un 10 %) tal como se mide mediante una técnica disponible en la técnica por ejemplo, mediante ELISA de competición o por medida de K_D con ensayo de BIACORE o KINEXA. La expresión también se puede aplicar cuando por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítipo en particular que es portado por un número de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico que porta el dominio de unión a antígeno será capaz de unirse de forma específica a los diversos antígenos que portan el epítipo. En consecuencia un anticuerpo monoclonal de la presente invención se une de forma específica a un epítipo localizado dentro de los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la forma madura de la miostatina.

La expresión "se une de forma preferente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un anticuerpo se une a un antígeno específico al menos aproximadamente 2, 3, 5, 10, 20, 22, 24, o 25 veces más de lo que se une a un antígeno diferente tal como se mide con una técnica disponible en la técnica por ejemplo, mediante ELISA de competición o por medida de K_D con ensayo de BIACORE o KINEXA. En consecuencia, un anticuerpo monoclonal de la presente invención se une preferentemente a GDF-8 con respecto a GDF-11. De forma análoga, un anticuerpo se puede unir preferentemente a un epítipo dentro de un antígeno sobre un epítipo diferente dentro del mismo antígeno.

El término "epítipo" se refiere a esa porción de la molécula capaz de ser reconocida por y que se une mediante un anticuerpo a una o más de las regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítipo son menudo consisten en un agrupamiento de moléculas de superficie químicamente activa tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y tienen características de estructura tridimensional específicas así como características de carga específicas. Por "epítipo de inhibición" y/o "epítipo de neutralización" se hace referencia a un epítipo, que cuando está en el contexto de la molécula intacta (en este caso, la miostatina) y cuando se une mediante un anticuerpo específico para el epítipo, da como resultado la pérdida o la disminución de una actividad biológica de la molécula u organismo que contiene la molécula, *in vivo* o *in vitro*.

El término "epítopo", tal como se usa en el presente documento, se refiere adicionalmente a una porción de un polipéptido que tiene actividad antigénica y/o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano. La expresión "epítopo antigénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de un polipéptido al que un anticuerpo se puede unir de forma específica tal como se determina con cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos convencionales. No es necesario que los epítopos antigénicos sean inmunogénicos, pero pueden ser inmunogénicos. Un "epítopo inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal, tal como se determina con cualquier procedimiento conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Geysen y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002 (1983)).

Las expresiones "propiedad biológica" o "bioactividad", "actividad" o "actividad biológica", por referencia a un anticuerpo de la presente invención, se usan indistintamente en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, afinidad de epítopo/antígeno, capacidad para neutralizar o antagonizar una actividad de miostatina *in vivo* o *in vitro*, CI_{50} en un ensayo de indicador de miostatina/SBE u otro ensayo de actividad *in vitro*, la estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades biológicas identificables de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos del péptido diana, o con otras proteínas o tejidos, por lo general), y capacidad para conservar niveles elevados de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características que se han mencionado anteriormente se pueden observar o medir o evaluar usando técnicas reconocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasma superficial, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* sin límite, unión al receptor, producción y/o secreción de citoquinas o factor de crecimiento, desarrollo del capuchón del animal *Xenopus*, transducción e inmunohistoquímica de señales con secciones de tejido de diferentes fuentes incluyendo ser humano, primate o cualquier otra fuente que pueda ser necesaria.

La expresión "actividad de miostatina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una o más actividades que regulan el crecimiento de forma fisiológica o morfogenéticas asociadas con proteína miostatina activa. Por ejemplo, la miostatina activa es un regulador negativo de la masa del músculo esquelético. La miostatina activa también puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos, y modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos.

El término "inhibir" o "neutralizar" tal como se usa en el presente documento con respecto a una actividad de un anticuerpo de la invención se refiere la capacidad de antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, ralentizar, alterar, eliminar, detener, reducir o invertir básicamente por ejemplo, la progresión o gravedad de lo que se está inhibiendo que incluye, pero no se limita a, una actividad o propiedad biológica, una enfermedad o una afección. La inhibición o neutralización es preferentemente al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o más elevada.

El término "aislado" cuando se usa con relación a un ácido nucleico o proteína (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o proteína que se identifica y se separa de al menos un contaminante con el que se asocia habitualmente en su fuente natural. Preferentemente, un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que está básicamente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un anticuerpo aislado que se une de forma específica a la miostatina y está básicamente libre de anticuerpos que se unen de forma específica a los antígenos distintos de la miostatina).

Las expresiones "numeración de Kabat" y "marcado de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estas expresiones, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo (Kabat, y *col.*, Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat, y *col.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación del NIH N° 91-3242 (1991)).

Un polinucleótido se "une de forma operativa" cuando se coloca dentro de una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une de forma operativa a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. Un péptido se "une de forma operativa" a otro péptido cuando los polinucleótidos que los codifican se unen de forma operativa, preferentemente están en el mismo marco de lectura abierta.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente", se usan indistintamente en el presente documento, y hacen referencia a un animal, preferentemente una especie de mamífero (incluyendo un no primate y un primate) o aviar, que incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, seres humanos, animales de granja mamíferos (por ejemplo, bovino, porcino, ovino), animales para deportes mamíferos (por ejemplo, equino), y mascotas mamíferas (por ejemplo, canina y felina); preferentemente los términos se refieren a seres humanos. Los términos también se refieren a especies aviares, que incluyen, pero no se limitan a, pollos y pavos. En una determinada realización, el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, se caracteriza adicionalmente por una enfermedad o trastorno o afección que se beneficiaría de una disminución del nivel o disminución de la bioactividad de la

miostatina. En otra realización el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, se caracteriza adicionalmente por que está en riesgo de desarrollar un trastorno, enfermedad o afección que se beneficiaría de una disminución del nivel de miostatina o una disminución de la bioactividad de la miostatina.

5 El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido que incluye, pero no se limita a, plásmidos y vectores virales. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que éstos se introducen mientras que otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula pues que, y de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se unen de forma operativa. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión") y los vectores a modo de ejemplo se conocen bien en la técnica.

10 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "célula huésped", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente e incluyen una célula individual o cultivo celular que es un receptor de cualquier polinucleótido aislado de la invención o cualquier vector o vectores recombinantes que comprenden una secuencia que codifica una HCVR, LCVR o anticuerpo monoclonal de la invención. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y puede que no sea necesario que la progenie sea completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN total) a la célula precursora original debido a mutación y/o cambio natural, accidental, o deliberado. Una célula huésped incluye células transformadas, transducidas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con uno o más vectores su recombinante es o un polinucleótido que expresa un anticuerpo monoclonal de la invención o una cadena ligera o cadena pesada del mismo. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención (incorporado de forma estable en el cromosoma huésped o no) también se puede denominar una "célula huésped a recombinante". Las células huésped preferentes para uso en la invención son células CHO (por ejemplo, CRL-9096 de la ATCC), células NS0, células SP2/0 y células COS (de la ATCC por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (CCL-2 de la ATCC). Las células huésped adicionales para uso en la invención incluyen células vegetales, células de levadura, otras células de mamífero y células procariontas.

Caracterización de Anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales, aislados que se unen específicamente a la miostatina con afinidad elevada. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanizados o porciones de unión a antígeno de los mismos y se unen preferentemente a la miostatina dentro de la región de la forma madura de miostatina que abarca los aminoácidos 40-64 o más preferentemente dentro de la región de la forma madura de miostatina que abarca los aminoácidos 43-57 y/o 45-59. Además, los anticuerpos de la invención neutralizan una actividad biológica de la miostatina *in vivo* o *in vitro*. La unión específica de anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención a la miostatina permite que los anticuerpos de la invención se usen como agentes terapéuticos o profilácticos para afecciones, enfermedades o trastornos asociados con la miostatina, es decir, afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de la reducción de los niveles de miostatina o que antagonizan o inhiben una actividad biológica de la miostatina. Además, los anticuerpos de la invención se pueden usar para diagnosticar o controlar afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de un nivel alterado o bioactividad de miostatina o para determinar el nivel de miostatina en una muestra.

40 En una realización preferente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que se une a la miostatina o una porción de la misma con una afinidad de unión (K_D) para la miostatina inferior o igual a aproximadamente 1×10^{-9} M, preferentemente inferior a aproximadamente 9×10^{-10} M o $8,7 \times 10^{-10}$ M o 8×10^{-11} M. Preferentemente los anticuerpos de la invención se caracterizan por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente 1×10^{-9} M o 9×10^{-10} M y lo más preferentemente por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente $8,7 \times 10^{-10}$ M o 8×10^{-11} M. Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar tal como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento o mediante el uso de cualquier procedimiento adecuado disponible en la técnica.

45 En otra realización preferente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que tiene una CI_{50} inferior o igual a aproximadamente 25 nM, 20 nM, 16 nM, 14 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, 5,2 nM o inferior en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* tal como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento. tales anticuerpos se pueden caracterizar adicionalmente por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente 1×10^{-9} M o 9×10^{-10} M y lo más preferentemente por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente $8,7 \times 10^{-10}$ M o 8×10^{-11} M. Tales anticuerpos se pueden caracterizar adicionalmente por la unión de forma preferente a la miostatina cuando se comparan con su capacidad para unirse a GDF-11 usando cualquier procedimiento disponible en la técnica, por ejemplo, ensayo de ELISA o ensayo de ELISA competitivo o un valor de K_D medido por ejemplo, con un ensayo de BIACORE o KINEXA.

50 En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene una reactividad cruzada inferior a aproximadamente un 35, 33, 30, 28, 25, 23, o un 20 % (más preferentemente, inferior a aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6, incluso más preferentemente, una reactividad cruzada inferior a aproximadamente un 5 o un 4 por ciento) con una proteína que no es miostatina (tal como, por ejemplo, GDF-11) o con un péptido que no es miostatina que consiste en al menos 15, 14, 13, 12, 11, 10 o 9 aminoácidos contiguos, tal

como se mide con una técnica convencional en la técnica tal como un ensayo de ELISA, un ensayo de ELISA competitivo o valores de K_D tal como se miren, por ejemplo, con un ensayo de BIACORE o KINEXA. Preferentemente un anticuerpo de la invención se une a la miostatina con un índice superior a 2, 3, 5, 10, 20, 22, 24 o 25 veces mayor que cuando se une con GDF-11, tal como se determina por ejemplo, mediante ensayo de ELISA de competición o BIACORE o KINEXA. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención no se unen a GDF-11 a niveles mayores que los niveles de fondo cuando se usa cualquier ensayo de unión disponible para un experto habitual en la materia. Un anticuerpo monoclonal de la invención se une a una forma monomérica o dimérica de la miostatina o una porción de la misma que comprende aminoácidos que abarcan los restos 40-64, 43-57 y/o 45-59 o miostatina madura.

Preferentemente los polipéptidos de miostatina y GDF-11 sometidos a ensayo para la unión preferente de un anticuerpo de la invención son ambas formas homodiméricas de la proteína madura, preferentemente de origen mamífero o aviar, incluso más preferentemente de origen humano. Sin embargo, los polipéptidos de miostatina y GDF-11 sometidos a ensayo para la unión preferente de un anticuerpo de la invención pueden ser la forma monomérica de la proteína madura o forma de proproteína o un polipéptido que comprende una porción de la proteína madura que abarca los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la forma madura de la proteína.

Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención se unen a un epítipo antigénico que se localizaba dentro de los aminoácidos 40-64 (SEC ID N°: 53 para ser humano) de la miostatina madura preferentemente dentro de los aminoácidos 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura. Además, un epítipo inmunogénico de miostatina de la invención se localiza dentro de los aminoácidos 40-64 de la miostatina madura (SEC ID N°: 53 para ser humano), preferentemente dentro de los aminoácidos 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura de cualquier especie de mamífero o aviar. También se contempla que un epítipo inmunogénico de la invención es un epítipo antigénico. El epítipo antigénico puede poseer restos adicionales de miostatina fuera de los aminoácidos 40-64 de la miostatina madura, pero los anticuerpos monoclonales de la invención no necesitan estos restos adicionales para unirse de forma especificada miostatina. Además, los restos de miostatina fuera de los aminoácidos 40-64 pueden afectar a la estructura conformacional del dominio antigénica y alterar de ese modo la unión de un anticuerpo de la invención al epítipo antigénico. Preferentemente los anticuerpos monoclonales de la invención no reaccionan de forma significativa (es decir, unión) con GDF-11 en comparación con el nivel con el que se unen a GDF-8. Más preferentemente, los anticuerpos monoclonales de la invención se unen a la miostatina al menos 2, 3, 5, 10, 20, 22, 24 o 25 veces más (por ejemplo, afinidad mayor o especificidad mayor) que con la que se unen a GDF-11 tal como se determina por ejemplo, mediante ensayo de ELISA, ensayo de ELISA de competición o valores de K_D en un ensayo de BIACORE o KINEXA.

Un péptido que consiste en aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 o 45-59 de la miostatina madura o cualquier péptido que consiste en un epítipo inmunogénico tal como se describe en el presente documento se puede usar como un péptido inmunogénico, preferentemente conjugado a una proteína vehículo por ejemplo, KLH, para generar anticuerpos monoclonales de la invención usando procedimientos disponibles para un experto en la materia. Se contempla que los restos de cisteína dentro de estos péptidos se pueden cambiar por restos de serina y aún funcionan como un epítipo inmunogénico. El péptido inmunogénico se puede usar para inmunizar un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón. Para un anticuerpo totalmente humano, el péptido inmunogénico se puede usar para inmunizar una cepa transgénica de ratón en la que la expresión genética de anticuerpo de ratón se suprime y se reemplaza de forma eficaz con expresión genética de anticuerpo humano. A continuación, los anticuerpos de anti-miostatina se aíslan a partir del animal inmunizado y se identifican sistemáticamente con procedimientos bien conocidos en la técnica para aislar esos anticuerpos que se unen de forma específica dentro del dominio que abarca los aminoácidos 40-64 de la miostatina madura, preferentemente dentro del dominio que abarca los aminoácidos 43-57 y/o 45-59 preferentemente identificado sistemáticamente para una afinidad de unión inferior a aproximadamente 3×10^{-8} M, 1×10^{-8} M o 1×10^{-9} M, preferentemente inferior a aproximadamente 9×10^{-10} M, $8,7 \times 10^{-10}$ M o 8×10^{-11} M y/o identificado sistemáticamente para una CI_{50} inferior o igual a aproximadamente 25 nM, 20 nM, 16 nM, 14 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, 5,2 nM o inferior en un ensayo de miostatina/SBE *in vitro* (véase el ensayo que se describe en el Ejemplo 6 en el presente documento).

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma conocido ampliamente en la técnica (véase por ejemplo, Kohler y col., Nature, 256: 495, 1975) o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo, tal como en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) u otros procedimientos disponibles en la técnica. Generalmente, un hibridoma se puede producir por fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con células que producen anticuerpos del animal inmunizado. La célula que produce anticuerpos, preferentemente las del bazo o nódulos linfáticos, se obtienen a partir de animales inmunizados en el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) se pueden aislar usando condiciones selectivas de cultivo, y clonar mediante dilución limitante. El medio de cultivo en el que las células de hibridoma crecen se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los mabs producidos mediante células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ELISA. Las células que producen anticuerpos con las propiedades de unión deseadas se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado de identificación sistemática. Los procedimientos para tal aislamiento e identificación sistemática se conocen bien en la técnica.

Se pueden usar otros procedimientos adecuados para producir o alisar anticuerpos que se unen dentro del dominio que abarca los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura, incluyendo anticuerpos humanos o artificiales, que incluyen, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante (por ejemplo, Fv o Fab de una sola cadena) a partir de una biblioteca, o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (véase por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555, 1993; Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258, 1993; Lonberg y col., Patente de Estados Unidos Número 5.545.806; Surani y col., Patente de Estados Unidos Número 5.545.807).

En el término "anticuerpo" también se incluyen anticuerpos de una sola cadena, y anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (injetados con CDR), así como anticuerpos de una sola cadena quiméricos o injertados con CDR, y similares, que comprenden porciones derivadas de diferentes especies. Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir en conjunto químicamente mediante técnicas convencionales, por vía sintética, o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, se pueden expresar ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada para que produzcan una proteína contigua. Véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Patente Europea N° 0.125.023 B1; Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Patente Europea N° 0.120.694 B1; documento de patente WO 86/01533; Patente Europea N° 0.194.276 B1; Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Patente Europea N° 0.239.400 B1 y Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089 y N° 5.698.762. Véase también, Newman, R. y col. BioTechnology, 10: 1455-1460, 1993, con respecto a anticuerpos primatizados, y Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 y Bird, R.E. y col., Science, 242: 423-426, 1988, con respecto anticuerpos de una sola cadena.

Además, también se pueden producir porciones funcionales de anticuerpos, que incluyen porciones de unión a antígeno de anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o de cadena individual. Las porciones funcionales de los anticuerpos mencionados anteriormente mantienen al menos una función de unión a antígeno y/o función o bioactividad biológica del anticuerpo de longitud completa a partir de los que provienen. Las porciones funcionales preferentes mantienen una función de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (por ejemplo, la capacidad para unirse a una forma madura de mamífero de miostatina). Las porciones o fragmentos funcionales particularmente preferentes mantienen la capacidad de inhibir una o más funciones o bioactividades características de una miostatina madura de mamífero, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, una porción o fragmento funcional puede inhibir la interacción de la miostatina madura con uno o más de sus ligados y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por receptores.

Las porciones de anticuerpos o fragmentos capaces de unirse a miostatina madura o una porción de la misma (preferentemente dentro de los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de la miostatina madura), incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂ y se incluyen en la invención. Tales fragmentos se pueden producir por escisión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos de Fab o F(ab')₂, respectivamente. El fragmento de unión a antígeno más pequeño es el Fv, que consiste en dos dominios de la HCVR y de la LCVR. El fragmento de Fab consiste en los dominios de HCVR-CH1 y LCVR-CL unidos de forma covalente con un enlace disulfuro entre las presiones constantes. Para superar la tendencia de los dominios de HCVR y LCVR unidos de forma no covalente en el Fv a disociarse cuando se co-expresan en una célula huésped, se puede construir un denominado fragmento de Fv (scFv) de una sola cadena (sc), en el que un polipéptido flexible y adecuadamente largo une el extremo de C de la HCVR al extremo de N de la LCVR o el extremo de C de la LCVR al extremo de N de la HCVR. El conector usado más habitualmente ha sido un resto de 15 péptidos (Gly₄Ser)₃, pero también se conocen otros conectores en la técnica. También se pueden producir anticuerpos en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se ha introducido uno o más codones de parada secuencia arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, se puede diseñar un gen quimérico y codifica una porción de cadena pesada de F(ab')₂ para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada.

Se ha demostrado que la selección de fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas que usan tecnologías de enriquecimiento tales como presentación de fagos (Matthews DJ y Wells JA. Science. 260: 1113-7, 1993), presentación de ribosomas (Hanes, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 14130-5, 1998), presentación de bacterias (Samuelson P., y col., Journal of Biotechnology. 96: 129-54, 2002) o presentación de levaduras (Kieckhefer MC, y col., Protein Engineering, 10: 1303-10, 1997) son alternativas satisfactorias a la tecnología clásica de hibridoma (revisiones recientes: Little M. y col., Immunology Today, 21: 364-70, 2000).

Variantes de Anticuerpos

Un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo humano (producidos por ejemplo, en un ratón transgénico) generados frente a un epítipo inmunogénico (aminoácidos 40-64, 43-57 o 45-59 de la miostatina madura) de la invención o frente a una proteína que comprende un epítipo inmunogénico de la invención es un anticuerpo precursor. Un anticuerpo precursor murino se puede alterar adicionalmente para crear una forma quimérica o humanizada del anticuerpo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden servir como anticuerpos precursores para variación o mutagénesis adicional. Los anticuerpos precursores de la invención se pueden mutagenizar adicionalmente por ejemplo, dentro del dominio o dominios de CDR (véase, por ejemplo, la Fig. 9) para crear una variante de anticuerpo con una propiedad de interés optimizada,

por ejemplo, afinidad de unión, Cl_{50} , especificidad, etc. Una variante de anticuerpo de sustitución de aminoácidos es preferente y tiene al menos un resto de aminoácidos de la molécula de anticuerpo precursor retirado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones de CDR, pero también se contemplan alteraciones del FR. Son preferentes las sustituciones conservativas de aminoácidos. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica del anticuerpo, entonces se pueden introducir más cambios básicos, es decir, cambios no conservativos de aminoácidos, y los productos se pueden identificar sistemáticamente.

Una forma conveniente para generar variantes de sustitución es la maduración de afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de la región CDR se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de este modo se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes de presentación de fagos se identifican sistemáticamente a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión, especificidad, Cl_{50}) tal como se desvela en el presente documento. Para identificar los sitios candidatos de la región CDR para modificación, se pueden preparar mutágenos de exploración de alanina para identificar restos de la región CDR que contribuyen de forma significativa a la unión a antígenos. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y la miostatina. Tales restos de contacto y restos vecinales son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento o que se conocen en la técnica. Como alternativa, o además, se puede realizar mutagénesis aleatoria en una o más secuencias de CDR en una o más posiciones del resto, cualquiera mientras que la CDR se une de forma operativa a la región variable o mientras que la CDR es independiente de otra secuencia de región variable y a continuación la CDR alterada vuelve a una región variable usando tecnología del ADN recombinante. Una vez que se generan y se expresan tales variantes de anticuerpos, el panel de variantes se somete a identificación sistemática tal como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Se puede sustituir cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de un anticuerpo anti-miostatina de la invención, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden añadir enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alteración se hace referencia a la supresión de uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo precursor.

La glicosilación de anticuerpos por lo general es unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de hidratos de carbono a la cadena lateral de un resto de asparaginas. Las secuencias de tripéptidos asparaginas-X-serina y asparaginas-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidratos de carbono a la cadena lateral de asparaginas. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxiserina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue de forma conveniente por alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos que se han mencionado anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

Secuencia

Un anticuerpo que comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5 comprende adicionalmente un polipéptido de la HCVR con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15. Un anticuerpo que comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10 comprende adicionalmente un polipéptido de la HCVR con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 26.

La estructura para llevar una CDR de la invención por lo general será una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo o una porción básica de la misma, en la que la CDR se localiza en una posición correspondiente a la CDR de la HCVR y LCVR de origen natural (Kabat y *col.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of HHS, 1991). Preferentemente, las tres regiones hipervariables (CDR) para cada cadena, ligera y pesada, se proporcionan en una región de marco conservado humano, por ejemplo, como una secuencia contigua representada con la siguiente fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. La cadena pesada o la cadena ligera FR1, FR2, FR3 y FR4 se combinan para formar el marco conservado completo cuando se colocan como una secuencia contigua con las CDR en el orden indicado.

Además además de las secuencias de CDR, la LCVR y la HCVR comprenden adicionalmente secuencia de marco conservado. En un anticuerpo humanizado para uso terapéutico en seres humanos, la secuencia de marco conservado es preferentemente total o básicamente de origen humano (es decir, al menos de un 85 %, un 87 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de origen humano). Preferentemente la región de marco conservado de cadena ligera de un anticuerpo humanizado, humano o quimérico de la invención es O2 tal como se muestra en la Fig. 7, formada por FR1 con la SEC ID N°: 65, FR2 con la SEC ID N°: 66, FR3 con la SEC ID N°: 67 y FR4 con la SEC ID N°: 68. Preferentemente la región de marco conservado de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, humano o quimérico de la invención es VH2-70 o VH4-39 tal como se muestra en las Figs. 5 y 6 respectivamente. El marco conservado de VH2-70 está formado por FR1 con la SEC ID N°: 69, FR2 con la SEC ID N°: 70, FR3 con la SEC ID N°: 71, y FR4 con la SEC ID N°: 72. VH4-39 está formado por FR1 con la SEC ID N°: 73, FR2 con la SEC ID N°: 74, FR3 con la SEC ID N°: 75 y FR4 con la SEC ID N°: 76. En un anticuerpo para uso en un animal no humano, la secuencia de la región de marco conservado se puede originar básicamente a partir del genoma humano (preferentemente usada en un animal no humano cuando es un embrión o recién nacido) o a partir del genoma del animal en el que se va a usar de forma terapéutica.

En una realización, un anticuerpo anti-miostatina de la invención en el que toda o una porción de la región variable se limita mediante una secuencia en particular tal como se muestra mediante una SEC ID N° en el presente documento se caracteriza adicionalmente por que es un anticuerpo quimérico, humanizado, o totalmente humano o porción de unión a antígeno del mismo que antagoniza o neutraliza al menos una actividad de miostatina *in vivo* o *in vitro*. Un anticuerpo anti-miostatina de la invención en el que toda o una porción de la región variable se limita mediante una secuencia en particular tal como se muestra mediante una SEC ID N° en el presente documento preferentemente se caracteriza adicionalmente por la unión preferentemente a GDF-8 con respecto a GDF-11. Más preferentemente tales anticuerpos se unen a la miostatina con una frecuencia de al menos aproximadamente 2, 3, 5, 10, 20, 22, 24, o 25 veces superior que la de la unión de GDF-11. Más preferentemente tales anticuerpos, cuando se expresan como Fabs, no se unen a GDF-11 por encima de niveles de fondo.

Un anticuerpo anti-miostatina de la invención en el que toda o una porción de la región variable se limita mediante una secuencia en particular tal como se muestra mediante una SEC ID N° en el presente documento se caracteriza preferentemente adicionalmente por (i) unión a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEC ID N°: 53, preferentemente un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEC ID N°: 62; y/o (ii) que tiene una Cl_{50} inferior o igual a aproximadamente 25 nM, 20 nM, 16 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, 5,7 nM en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* y/o (iii) que tiene una afinidad de unión (K_D) hacia la miostatina inferior a aproximadamente 1×10^{-8} M o 1×10^{-9} M, preferentemente inferior a aproximadamente 9×10^{-10} M o $8,7 \times 10^{-10}$ M o 8×10^{-11} M; como alternativa se caracteriza por una K_D para miostatina no superior a aproximadamente 1×10^{-9} M o 9×10^{-10} M; más preferentemente una K_D no superior a aproximadamente $8,7 \times 10^{-10}$ M y lo más preferentemente una K_D no superior a aproximadamente 8×10^{-11} M.

Expresión de Anticuerpos

La presente invención también se refiere a líneas celulares que expresan un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención o porción del mismo. La creación y el aislamiento de líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se puede realizar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Las líneas celulares preferentes incluyen COS, CHO, SP2/O, NS0 y levadura (disponibles en depósitos públicos tales como la ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA).

Se puede usar una amplia diversidad de sistemas de expresión de huésped para expresar un anticuerpo de la presente invención que incluye sistemas de expresión procariota (bacteriano) y eucariota (tales como levadura, baculovirus, vegetal, mamífero y otras células animales, animales transgénicos, y células de hibridoma), así como sistemas de expresión de presentación de fagos. Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC119 y un vector de expresión eucariota adecuado es un vector pcADN3.1 con un sistema de selección de DHFR debilitado. En la técnica también se conocen otros sistemas de expresión de anticuerpos y se contemplan en el presente documento.

Un anticuerpo de la invención se puede preparar mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transforma, transduce, infecta o similar con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y/o pesada se expresan en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de promotores diferentes a los que se unen de forma operativa en un vector o, como alternativa, la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de diferentes promotores a los que se unen de forma operativa en dos vectores – uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera. Opcionalmente la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar en diferentes células huésped. Preferentemente, los anticuerpos recombinante se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir del que los anticuerpos se pueden recuperar o purificar. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante, e introducir los vectores en células huésped. Tales tecnologías convencionales de ADN recombinante se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch, y Maniatis (Eds.), Molecular

Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, y *col* (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1989.

5 Un ADN aislado que codifica una región de HCVR se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante unión de forma operativa del ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifican regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de genes humanos de región constante de cadena pesada se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat, y *col.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación del NIH N° 91-3242 (1991). Se pueden obtener fragmentos de ADN que incluyen estas regiones por ejemplo, mediante amplificación de PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser cualquier tipo, (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) o subclase de región constante y cualquier variante alotípica de la misma tal como se describe en Kabat (mencionado anteriormente). Como alternativa, la porción de unión a antígeno puede ser un fragmento de Fab, fragmento de Fab', fragmento de F(ab')₂, Fd, o un fragmento de Fv de una sola cadena (scFv). Para un fragmento de Fab de cadena pesada, el ADN que codifica la HCVR se puede unir de forma operativa a otra molécula de ADN que codifican solamente una región constante CH1 de cadena pesada.

20 Un ADN aislado que codifica una región de LCVR se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud total (así como en un gen de cadena ligera de Fab) mediante unión de forma operativa del ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifican una región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes humanos de región constante de cadena ligera se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat, mencionado anteriormente. Se pueden obtener fragmentos de ADN que incluyen estas regiones mediante amplificación de PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

25 Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican HCVR y LCVR –se unen de forma operativa a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifican la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias de HCVR y LCVR se pueden expresar como una proteína contigua de una sola cadena, con las regiones de LCVR y HCVR unidas al conector flexible. Véase, por ejemplo, Bird, y *col.*, Science 242: 423-6, 1988; Huston, y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83, 1988; McCafferty, y *col.*, Nature 348: 552-4, 1990.

30 Para expresar un anticuerpo de la invención, se inserta un ADN que codifica una cadena ligera y/o pesada de longitud parcial o completa, obtenido tal como se ha descrito anteriormente, en un vector de expresión de modo que el gen se une de forma operativa a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más habitualmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales. Además, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina a partir de una célula huésped. El gen de cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina se puede clonar en el vector de modo que el péptido de señal se une de forma operativa en marco con el extremo camino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo.

40 Además del gen o genes de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención lleva secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen o genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación), cuando sea necesario, que controlan la transcripción o la traducción del gen o genes de cadena del anticuerpo. El diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada. Las secuencias reguladoras preferentes para la expresión de célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles elevados de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciales derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de Simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y virus de polioma.

50 Además de los genes de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y uno o más genes marcadores que se pueden seleccionar. El gen marcador que se puede seleccionar facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, por lo general, el gen marcador que se puede seleccionar confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores que se pueden seleccionar preferentes incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped sin DHFR con selección/amplificación de metotrexato), el gen *neo* (para selección de G418), y glutamina sintetasa (GS) en una línea celular negativa para GS (tal como NS0) para selección/amplificación.

60

Para la expresión de las cadenas ligera y/o pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y/o ligera se introduce en una célula huésped mediante técnicas convencionales por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección de DEAE-dextrano, transducción, infección y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, son preferentes las células eucariotas, y lo más preferentemente células huésped de mamífero, porque es más probable que tales células se ensamblen y secreten un anticuerpo plegado e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero preferentes para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células DHFR-CHO, que se describen en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20, 1980, usadas con un marcador que se puede seleccionar de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159: 601-21, 1982, células de mieloma NS0, células COS, y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar de la célula huésped y/o el medio de cultivo usando procedimientos de purificación convencionales.

También se pueden usar células huésped para producir porciones, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, fragmentos de Fab o moléculas de scFv mediante técnicas que son convencionales. Un experto en la materia entenderá que dentro del alcance de la presente invención se producen variaciones en el procedimiento anterior. Por ejemplo, se puede desear transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. También se puede usar tecnología del ADN recombinante para retirar parte o todo el ADN que codifica de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para la unión a la miostatina. Las moléculas expresadas a partir de estas moléculas de ADN truncado también se incluyen en los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferente para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células DHFR-CHO por ejemplo, mediante transcripción mediada con fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen de forma operativa cada uno a elementos de regulación potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento de regulación del potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento de regulación del potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación de metotrexato. Las células huésped transformante seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención se pueden expresar en un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, y col., Nucleic Acids Res. 20: 6287-95, 1992).

Una vez que se expresan, los anticuerpos intactos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen precipitación en sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, en fase inversa, en columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Son preferentes las inmunoglobulinas básicamente puras con una homogeneidad de al menos un 90 %, un 92 %, un 94 % o un 96 %, y las más preferentes con una homogeneidad de un 98 a un 99 % o superior, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad si se desea, los péptidos se pueden usar a continuación terapéutica o profilácticamente, tal como se indica en el presente documento.

Anticuerpo quimérico

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero formado por una cadena pesada quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena ligera quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero formado por dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera asociados a través de al menos un puente disulfuro.

Una cadena pesada quimérica de un anticuerpo comprende una región de unión a derivada de la cadena pesada de un anticuerpo no humano específico para la miostatina, que se une de forma operativa al menos a una porción de una región constante de cadena pesada humana o básicamente humana (o especies diferentes a aquellas a partir de las que se originó la región de unión a antígeno). Una cadena ligera quimérica de un anticuerpo comprende una región de unión a antígeno originada total o básicamente a partir de la cadena ligera de un anticuerpo no humano unido de forma operativa al menos a una porción de una región constante de cadena ligera (CL) humana o básicamente humana (o especies diferentes a aquellas a partir de las que se originó la región de unión a antígeno). También se pueden preparar anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas pesadas y cadenas ligeras

quiméricas de la misma o diferente especificidad de unión a la región variable, mediante la asociación apropiada de las cadenas de polipéptidos individuales, de acuerdo con etapas de procedimiento conocidas.

Con este enfoque, las cadenas pesadas quiméricas que expresan huéspedes se cultivan de forma separada a partir de huéspedes que expresan cadenas ligeras quiméricas, y las cadenas de inmunoglobulina se recuperan de forma separada y a continuación se asocian. Como alternativa, los huéspedes se pueden cocultivar y permitir que las cadenas se asocien de forma espontánea en el medio de cultivo, seguido de recuperación de la inmunoglobulina o fragmento ensamblados. En la técnica se conocen procedimientos para producir anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, Patentes de estados Unidos N°: 6.284.471; N° 5.807.715; N° 4.816.567; y N° 4.816.397).

Anticuerpos humanizados

Preferentemente un anticuerpo a usar para fines terapéuticos, tendría la secuencia del marco conservado y la región constante (hasta el punto en el que existe en el anticuerpo) originado a partir del mamífero en el que se usaría como un agente terapéutico con el fin de disminuir la posibilidad de que el mamífero provocaría una respuesta inmune frente al anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos humanizados son de interés en particular dado que se considera que son valiosos para aplicación terapéutica y para evitar la respuesta al anticuerpo anti-ratón humano observada frecuentemente con anticuerpos de roedor. Además, en anticuerpos humanizados, la porción efectora es humana de modo que puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruir las células diana de forma más eficaz mediante citotoxicidad dependiente de complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Además, los anticuerpos humanizados inyectados pueden tener una vida media más similar a la de los anticuerpos humanos de origen natural por ejemplo, anticuerpos de murino, permitiendo de ese modo la administración de dosis más pequeñas y menos frecuentes. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende porciones de anticuerpos de origen diferente, en el que al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de un anticuerpo de origen no humano con la especificidad necesaria, tal como un ratón, y de un anticuerpo de origen humano, unidas en conjunto químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, síntesis) o preparadas en forma de un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética.

Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" tiene las CDR que se originan a partir de un anticuerpo no humano (preferentemente un anticuerpo monoclonal de ratón) aunque el marco conservado y la región constante, hasta el punto en que están presentes, (o una porción significativa o básica de los mismos, es decir, al menos aproximadamente un 85 %, un 87 %, un 90 %, un 92 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 %) están codificados por una información de la secuencia de ácidos nucleicos que se produce en la región de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase, por ejemplo, la Bases de Datos Internacional ImMunoGeneTics) o en formas de combinadas o mutadas de la misma tantos si tales anticuerpos se producen o no en una célula humana. Las CDR de un anticuerpo humanizado se pueden optimizar a partir de las CDR de un anticuerpo precursor no humano a partir del que se originan para generar propiedades deseadas, por ejemplo, especificidad, afinidad y capacidad. Las CDR optimizadas pueden tener sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos, cuando se comparan con las CDR precursoras. Por ejemplo, las posiciones de los aminoácidos de las SEC ID N°s: 57, 30, 58, 59, 60, y 61 que están subrayadas y en letra negrita en la Fig. 9 son posiciones que se han optimizado a partir de las CDR precursoras tal como se muestra en las Figs 10 y 11. Sin embargo, se contempla que cualquier anticuerpo anti-miostatina no humano (i) generado frente a un péptido que consiste en una secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 53 o 62 o (ii) generado frente a un péptido que comprende la secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 53 o 62 y reactivos frente a un péptido que consiste en la secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 53 o 62, puede servir como un anticuerpo precursor que se puede convertir en un anticuerpo humanizado o quimérico usando procedimientos convencionales disponibles en la técnica.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) incluyen un anticuerpo intacto, un anticuerpo básicamente intacto, una porción de un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno, o una porción de un anticuerpo que comprende un fragmento de Fab, fragmento de Fab', F(ab')₂, o un fragmento de Fv de una sola cadena. Los anticuerpos humanizados contienen preferentemente una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados también puede comprender restos que no se encuentran y en el anticuerpos receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todos o básicamente todos los aminoácidos en las regiones CDR que corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o básicamente todos los aminoácidos en las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende de forma óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. [Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

Los anticuerpos humanizados se pueden someter a mutagénesis *in vitro* usando procedimientos de uso rutinario en la técnica (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de la región de marco conservado de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinante es humanizado son secuencias que, aunque tienen su origen en las relacionadas con las secuencias de HCVR y LCVR de línea germinal humana, puede no existir de forma natural dentro del repertorio de la

línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*. Se contempla que tales secuencias de aminoácidos de las regiones de marco conservado de HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinante son humanizados son idénticas en al menos un 85 %, un 87 %, un 90 %, un 92 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 98 % o lo más preferentemente al menos un 99 % a la secuencia de la línea germinal humana. Preferentemente, se mantendrán esos restos de marco conservado del anticuerpo precursor (por ejemplo, anticuerpo murino o generalmente el anticuerpo a partir de que se origina el anticuerpo humanizado) que mantienen o afectan a estructuras de sitio de combinación. Estos restos se pueden identificar por ejemplo, por cristalografía de rayos X del anticuerpo precursor o fragmento de Fab, identificando de ese modo la estructura tridimensional del sitio de unión a antígeno.

El anticuerpo humanizado puede comprender o puede tener su origen en un marco conservado de cadena ligera de línea germinal humana. En realizaciones en particular, la secuencia de la línea germinal de cadena ligera se selecciona entre secuencias de VK humanas que incluyen, pero no se limitan a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, 012, 014, 018, 02, 04, y 08. En determinadas realizaciones, este marco conservado de línea germinal humana de cadena ligera se selecciona entre V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, y V5-6. Véase el documento de PCT WO 2005/005604 para una descripción de diferentes secuencias de la línea germinal.

En otras realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender o puede tener su origen en un marco conservado de cadena pesada de línea germinal humana. En realizaciones en particular, este marco conservado de línea germinal humana de cadena pesada se selecciona entre VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, y VH7-81. Véase el documento de PCT WO 2005/005604 para una descripción de diferentes secuencias de la línea germinal.

En realizaciones en particular, la región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada comprende una región de marco conservado cual menos una porción de una región de marco conservado (por ejemplo, que contiene 2 o 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En determinadas realizaciones, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es totalmente humana. En otras realizaciones, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es totalmente humana. En algunas realizaciones, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias consenso humanas para el marco conservado en particular. En otras realizaciones, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias consenso humanas para el marco conservado en particular. En realizaciones preferentes, la región de marco conservado es una región humana de marco conservado.

En general, se pueden producir anticuerpos humanizados mediante la obtención de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la HCVR y LCVR de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo murino por el anticuerpo se puede mediante un hibridoma, que se une a miostatina, epítipo de la invención, identificando las CDR en dichas HCVR y LCVR (no humanas), e injertando tales secuencias de ácidos nucleicos que codifican CDR sobre secuencias de ácidos nucleicos que codifican marco conservado humano seleccionado. Opcionalmente, una región de CDR se puede optimizar mediante mutagénesis de forma aleatoria o en posiciones en particular con el fin de sustituir, suprimir, o añadir uno o más aminoácidos en la CDR antes del injerto a la región de CDR en la región de marco conservado. Como alternativa, una región de CDR se puede optimizar después de la inserción en la región de marco conservado humano usando procedimientos disponibles para un experto en la materia. Preferentemente, las secuencias de aminoácidos de marco conservado humano se seleccionan de modo que el anticuerpo resultante probablemente va a ser adecuado para administración *in vivo* en seres humanos. Esto se puede determinar, por ejemplo, en base al uso previo de anticuerpos que contienen tal secuencia de marco conservado humano. Preferentemente, la secuencia de marco conservado humano por sí misma no será significativamente inmunogénica.

Como alternativa, las secuencias de aminoácidos de los marcos conservados para el anticuerpo a humanizar se pueden comparar con las secuencias de marco conservado humanos conocidas, las secuencias de marco conservado humanos a usar para injerto de CDR y se pueden seleccionar en base a sus secuencias constituyentes altamente similares a las del anticuerpo precursor, por ejemplo, un anticuerpo murino que se une a miostatina. Se han aislado numerosas secuencias de marco conservado humanos y sus secuencias se han informado en la técnica. Esto aumenta la probabilidad de que el anticuerpo humanizado injertado con CDR resultante, que contiene las CDR de las CDR precursoras (por ejemplo, murino) u optimizadas del anticuerpo precursor injertado en marcos conservados humanos seleccionados (y posiblemente también la región constante humana) mantendrán básicamente la estructura de unión a antígeno y de este modo mantendrán la afinidad de unión del anticuerpo precursor. Para mantener un grado significativo de afinidad de unión a antígeno, las regiones de marco conservado humano seleccionadas serán preferentemente aquéllas de las que se espera que sean adecuadas para administración *in vivo*, es decir, no inmunogénicas.

En cualquier procedimiento, se obtienen la secuencia de ADN que codifica las regiones HCVR y LCVR del anticuerpo anti-miostatina preferentemente murino. En la técnica se conocen bien procedimientos para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas. Tales procedimientos, por ejemplo, pueden implicar

la amplificación de las secuencias que codifican inmunoglobulina a clonar usando cebadores apropiados mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los celadores adecuados para amplificar secuencias de ácidos nucleicos de inmunoglobulina, y específicamente secuencias de HCVR y LCVR de murino se han informado en la bibliografía. Después de haber clonado tales secuencias que codifican inmunoglobulina, se secuencian mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Después de injertar las secuencias que codifican CDR en las secuencias que codifican marco conservado humano seleccionado, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias variables pesadas y variable ligera "humanizadas" se expresan a continuación para producir un Fv humanizado o anticuerpo humanizado que se une a la miostatina. Las HCVR y LCVR humanizadas se pueden expresar como parte de una molécula entera de anticuerpo anti-miostatina, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humanas cuyas secuencias de codificación de ADN se han obtenido a partir de una biblioteca disponible en el mercado o que se han obtenido usando, por ejemplo, uno de los procedimientos que se han descrito anteriormente para obtener secuencias de ADN, o se encuentran en la técnica. Sin embargo, las secuencias de las HCVR y LCVR también se pueden expresar en ausencia de secuencias constantes para producir un anti-miostatina Fv humanizado. Sin embargo, la fusión de secuencias constantes humanas en la región variable se desea potencialmente porque el anticuerpo anti-miostatina humanizado resultante puede poseer funciones efectoras humanas.

Los procedimientos para sintetizar ADN que codifica una proteína de secuencia conocidas son bien conocidos en la técnica. Usando tales procedimientos, se sintetizan secuencias de ADN que codifican las secuencias de HCVR y LCVR humanizadas objeto (con o sin regiones constantes), y a continuación se expresan en un sistema de vector adecuado para la expresión de anticuerpos recombinantes. Esto se puede realizar en cualquier sistema de vector que proporcione las secuencias de HCVR y LCVR humanizadas sujeto a expresar como una proteína de fusión consecuencias de dominio constante humano y que se asocie para producir anticuerpos (unión a antígeno) o fragmentos de anticuerpos funcionales.

Las secuencias de dominio constante humano son bien conocidas en la técnica, y se han informado en la bibliografía. Las secuencias de cadena ligera constante humana preferentes incluyen las secuencias de cadena ligera constante kappa y lambda. Las secuencias de cadena esa constante humana preferentes incluyen IgG₁ humana, IgG₂ humana, IgG₃ humana, IgG₄ humana, y versiones mutadas de las mismas que proporcionan función efecto de la alterada, por ejemplo, aumento de vida media *in vivo*, reducción de unión al receptor de Fc o alteración del perfil de desamidación.

Si estuvieran presentes, las regiones de marco conservado humano tiene su origen preferentemente en una de anticuerpo humano que tiene similitud de secuencia con la región análoga o equivalente del dador de la región de unión a antígeno (es decir, el anticuerpo precursor). Otras fuentes de regiones de marco conservado para porciones de origen humano de anticuerpo humanizado incluyen secuencias consenso variables humanas (véase por ejemplo, Kettleborough, C.A. y col. *Protein Engineering* 4: 773-783 (1991); Carter y col., documento de patente WO 94/04679. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la porción no humana se puede comparar con las secuencias humanas tal como se describe en Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). En una realización particularmente preferente, las regiones de marco conservado de una cadena de anticuerpo humanizado tienen su origen en una región variable humana que tiene una identidad de secuencia global de al menos aproximadamente un 60 %, preferentemente una identidad de secuencia global de al menos aproximadamente un 70 % y más preferentemente una identidad de secuencia global de al menos aproximadamente un 85 %, con la región variable del donante no humano. Una porción humana también puede tener su origen en un anticuerpo humano que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 65 %, y preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70 %, dentro de la porción en particular (por ejemplo, FR) que se está usando, cuando se compara con la porción equivalente (por ejemplo, FR) del donante no humano.

Las referencias que describen adicionalmente procedimientos implicados en la humanización de un anticuerpo de ratón que se pueden usar se encuentran por ejemplo, en Queen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2869, 1991; Patente de Estados Unidos N° 5.693.761; Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; los programas informáticos ABMOD y ENCAD tal como se describe en Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620, 1983; la humanización se puede realizar básicamente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)].

Usos

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, profilácticas, de diagnóstico y de investigación tal como se describe en el presente documento. Un anticuerpo de la invención se puede usar para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociado con la expresión de la miostatina humana. De una forma similar, el anticuerpo de la invención se puede usar en un ensayo para controlar los niveles de miostatina en un sujeto que se está tratando para una afección asociada con la miostatina. Los ensayos de diagnóstico incluyen procedimientos que usan el anticuerpo de la invención y una marca para detectar miostatina en una muestra, por ejemplo, en un fluido corporal humano o en un extracto celular o tisular. Los anticuerpos de la invención se pueden usar con o sin

modificación, y se marcan mediante unión covalente o no covalente de un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo tal como, por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o peroxidasa de rábano picante. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar de forma separada el anticuerpo con el resto detectable, incluyendo los procedimientos que se describen en Hunter, *y col.*, *Nature* 144: 945, 1962; David, *y col.*, *Biochemistry* 13: 1014, 1974; Pain, *y col.*, *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; y Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.* 30: 407, 1982.

En la técnica se conoce una diversidad de protocolos convencionales para medir la miostatina, incluyendo por ejemplo, ELISA, RIA, y FACS, y proporcionar una base para el diagnóstico de niveles alterados o anómalos de expresión de la miostatina. Los valores de expresión normales o convencionales se establecen usando cualquier técnica conocida en la materia, por ejemplo, por combinación de la muestra que comprende un polipéptido de miostatina, por ejemplo, con anticuerpos en condiciones adecuadas para formar un complejo de antígeno:anticuerpo. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y ejemplos de un material radiactivo incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . (Véase, por ejemplo, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)).

La cantidad de un complejo convencional formado se cuantifica mediante diversos procedimientos, tales como, por ejemplo, medios fotométricos. Las cantidades de polipéptido de miostatina expresado en sujeto, control, y muestras (por ejemplo, a partir de tejido biopsiado) se comparan a continuación con los valores estándar. La desviación entre los valores estándar y sujeto establece parámetros para la correlación de un trastorno, estado, afección, síndrome, o enfermedad en particular con un determinado nivel de expresión (o carencia del mismo) para un polipéptido de miostatina.

Una vez que se establece la presencia de un trastorno, estado, afección, síndrome, o enfermedad y comienza el protocolo de tratamiento, los ensayos se repiten en una base regular para controlar el nivel de expresión de miostatina. Los resultados obtenidos de sucesivos ensayos se usan para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período de tiempo que varía de varios días a meses. Con respecto a un trastorno en particular (por ejemplo, debilidad o caquexia) la presencia de la cantidad alterada de miostatina en tejido o fluido biopsado (por ejemplo, suero u orina) de un sujeto puede indicar una predisposición hacia el desarrollo de un trastorno, estado, afección, síndrome, o enfermedad o puede proporcionar un medio para detectar tal trastorno, estado, afección, síndrome, o enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales o de definir una población que con más probabilidad responde de forma terapéutica a un anticuerpo de la invención. Una detección inicia más definitiva puede permitir el tratamiento más temprano previniendo y/o mejorando de ese modo la progresión adicional de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de miostatina, por ejemplo, deterioro del músculo o de hueso.

Como una cuestión de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, una combinación envasada de reactivos en cantidades determinadas previamente con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluir a sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos puede variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que básicamente optimizan la sensibilidad del ensayo. De forma particular, los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que, en disolución, proporcionarán una solución de reactivo que tenga la concentración apropiada.

Usos Terapéuticos para el Anticuerpo

La miostatina desempeña un papel en el desarrollo muscular y un número de trastornos o enfermedades relacionados. En adultos, el ARNm de la miostatina se detecta principalmente en el músculo esquelético aunque también se encuentran concentraciones más bajas en el tejido adiposo y en el tejido cardiaco (Sharma, M., *y col.*, *J. Cell Physiol.* 180: 1, 1999). Los ratones genosuprimidos para miostatina tienen una masa muscular dos o tres veces mayor que sus compañeros de camada de tipo silvestre. El aumento de la masa muscular es el resultado de la hipertrofia e hiperplasia de la fibra (McPherron, A., *y col.*, *Nature* 387: 83-90, 1997 y Zhu, X. *y col.*, *FEBS Letters* 474: 71). Además, los ratones genosuprimidos para miostatina acumulan menos grasa que sus compañeros de Cámara de tipo silvestre pero de otro modo parecen normales y sanos. También se ha mostrado recientemente que la miostatina es un regulador importante de la adipogénesis (Rebbapragada, A., *y col.*, *Mol. y Cell. Bio.* 23: 7230-7242, 2003). Además, se ha estudiado recientemente la estructura y el contenido óseos en ratones con déficit de miostatina (Hamrick M.W., *y col.*, *J. Orthopaedic Research* 21: 1025, 2003; Hamrick, M.W., *y col.*, *Calcif Tissue Int* 71: 63, 2002).

Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención se puede usar para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea, disminuir la atrofia muscular, o puede ser útil para el tratamiento o prevención de afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables a la disminución de niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico en mamíferos, preferentemente seres humanos, que incluye, pero no se limita a, atrofia muscular, lesión muscular, cirugía, reparación de músculo dañado, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamento, obesidad, supresión de acumulación de grasa corporal, obesidad, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía de cuidado crítico, miopatía alcohólica, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por el VIH, o que resulta de EPOC, enfermedad pulmonar crónica, recuperación de sepsis, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico, atrofia muscular después de quemadura, y diabetes de Tipo II. La atrofia por desuso puede dar como resultado numerosas causas o incidentes que incluyen cualquier trastorno o enfermedad o estado que conduce a la inmovilidad prolongada o desuso o descanso en cama que incluye, pero no se limita a, trasplante de órganos sólidos, sustitución de articulaciones, apoplejía, lesión de la médula espinal, recuperación de quemaduras graves, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación después de sepsis y exposición a microgravedad. Dado que la miostatina se conserva altamente en secuencia y funciona a través de las especies, los anticuerpos de la invención se pueden usar para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea o tratar o prevenir afecciones en mamíferos no humanos o especies caviares [por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, canino y felino), animales para deportes (por ejemplo, equino), animales fuente de alimentos (por ejemplo, bovino, porcino y ovino), especies aviares (por ejemplo, pollo, pavo, otras aves de caza o aves de corral)] en los que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico.

En el presente documento se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente en los que la actividad de la miostatina es perjudicial o que se benefician de la disminución de los niveles de miostatina bioactiva. Además, se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "que trata", y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcialmente de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, incluye administración de un compuesto de la presente invención para tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la padece; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de la misma. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente tal como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Composición Farmacéutica

Un anticuerpo de la invención se prevé incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo, diluyente, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis individuales o múltiples. Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usan diluyentes, vehículos, y/o excipientes tales como agentes de dispersión, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes de solubilización, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares farmacéuticamente aceptables cuando sea apropiado. Dichas composiciones se diseñan de acuerdo con técnicas convencionales tal como por ejemplo, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19^a Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación tal como lo conocen generalmente los profesionales.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención se puede administrar a un sujeto con riesgo o que padece patologías tal como se describe en el presente documento usando técnicas de administración convencionales que incluyen administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, tras técnica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o supositorio.

Una composición farmacéutica de la invención es preferentemente una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que

cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, se sopesa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, dado que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz es al menos la dosis mínima, pero inferior a la dosis tóxica, de un agente activo que es necesario para transmitir beneficio terapéutico a un sujeto. indicado de otro modo, una cantidad terapéutica mente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad en la que, en mamíferos, preferentemente seres humanos, aumenta la masa muscular, aumenta la densidad ósea, o tratar afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina da como resultado un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano, que incluyen, pero no se limitan, atrofia muscular, lesión muscular, cirugía debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamento, obesidad, supresión de acumulación de grasa corporal, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía de cuidado crítico, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por el VIH, o que resulta de EPOC, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico y diabetes de Tipo II. La atrofia por desuso puede dar como resultado numerosas causas o incidentes que incluyen cualquier trastorno o enfermedad o patología que conduce a inmovilidad prolongada o desuso o descanso en cama que incluyen, pero no se limitan a, trasplante de órganos sólidos, sustitución de articulaciones, apoplejía, lesión de la médula espinal, recuperación de quemaduras graves, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación después de sepsis y exposición a microgravedad.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación, o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Es preferente la administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para tales inyecciones son evidentes en la técnica.

La composición farmacéutica por lo general debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en el envase proporcionado, que incluye por ejemplo, un vial cerrado herméticamente o jeringa. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas se pueden filtrar de forma estéril después de fabricar la formulación, o de otro modo se pueden fabricar de forma microbiológicamente aceptable. Una composición habitual para infusión intravenosa podría tener un volumen de tanto como 250-1000 ml de fluido, tal como solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéutica mente eficaz, (por ejemplo, de 1 a 100 mg/ml, o superior) de concentración de anticuerpo. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto en particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se están administrando de forma simultánea. Una dosis habitual puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se conciben dosis inferiores o superiores a este intervalo a modo de ejemplo, especialmente teniendo en cuenta los factores que se han mencionado anteriormente. El régimen diario de dosificación parenteral puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a 1 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día. El progreso se puede controlar mediante evaluación periódica. Para administraciones repetidas durante varios días o periodos más largos, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no se excluyen de los mismos. La dosificación deseada se puede administrar mediante una administración de un solo bolo, mediante administraciones de múltiples bolos, o mediante administración de infusión continua de anticuerpo, dependiendo del patrón del deterioro farmacocinético que el profesional desea conseguir.

Estas cantidades de anticuerpos sugeridas están sometidas en gran medida al criterio terapéutico. El factor fundamental para la selección de una dosis apropiada y programación es el resultado obtenido. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo en particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para almacenamiento y reconstitución en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo. Puede ser necesario el ajuste de las dosificaciones para compensar lo anterior. Generalmente, el pH preferente está entre 6 y 8.

Artículos de Fabricación.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o prevención de los trastornos o afecciones que se han descrito anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una marca. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los envases se pueden formar a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición de la invención que es eficaz para prevenir o tratar el trastorno o afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un anticuerpo anti-miostatina de la invención. La marca en el envase, o asociada al mismo, indica que la composición se para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable a, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayos de ELISA

A. Los Fab anti-miostatina unen preferentemente miostatina sobre GDF-11.

Los Fab anti-miostatina (o los mAb de longitud completa) de la presente invención se someten a ensayo en un ensayo de ELISA, en el que se mide la unión del Fab a miostatina madura (forma dimérica) revestido a diversas concentraciones en una placa de 96 pocillos. También se somete a ensayo la unión de los Fab a GDF-11.

Cada pocillo de dos placas de 96 pocillos se reviste con 200 ng/pocillo de miostatina de ratón recombinante (R&D systems, N° de Cat. 788-G8/CF, libre de vehículo, en tampón de carbonato, pH 9,6) o 200 ng/pocillo de GDF-11 humano recombinante (Peprotech, Inc., N° de Cat. 120-11, libre de vehículo, en tampón de carbonato, pH 9,6). Las placas se incuban a 4 °C durante una noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con tampón de lavado (Tris (hidroximetil) aminometano 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,1 %). Las placas se bloquean con 200 µl de tampón del bloqueo por pocillo (Leche Instantánea de Carnation al 5 % en el tampón de lavado anterior) durante 5 horas.

Los Fab o mab a someter a ensayo se diluyen en tampón de bloqueo a diversas concentraciones, por ejemplo, 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml, y 0,016 µg/ml. Se añaden cincuenta microlitros de cada solución de Fab a los pocillos revestidos con GDF-8 y GDF-11 por duplicado. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con tampón de lavado. Se añade anticuerpo secundario conjugado con AP (50 µl de AP anti-kappa de cabra (Southern Biotech), diluido a 1:1000 en tampón de bloqueo) a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con tampón de lavado. Se añaden cincuenta microlitros de sustrato cromogénico (*es decir*, sustrato de AP) a cada pocillo y se permite que se desarrolle a temperatura ambiente. La absorbancia de los pocillos se lee a DO de 560 nm. Se determina la absorbancia media de los pocillos duplicados.

Se contempla que todos los anticuerpos de la invención se unan a miostatina madura humana unida a placa y preferentemente se una miostatina cuando se compara con la unión a GDF-11. En un ELISA reducido para GDF-8, Fab C12 tiene una CI_{50} de 0,25 µg/ml y Fab 510C2 tiene una CI_{50} de 0,27 µg/ml.

B. Los anticuerpos anti-miostatina optimizados con Humanizados se unen a péptido de miostatina

En un ensayo de ELISA, los anticuerpos de la invención se unen a péptido biotinilado, purificado con la secuencia que abarca los aminoácidos 40-64 de la miostatina humana madura (SEC ID N°: 53) con la excepción de que un ácido aminobutírico está en la posición 47 en lugar del resto de cisteína. Los anticuerpos de la invención también se unen a un péptido con la secuencia que se muestra la SEC ID N°: 62 (con cisteína o serina en la posición 47 de la miostatina madura) así como la forma madura de miostatina en las formas monomérica y dimérica.

En un ensayo de ELISA a modo de ejemplo, se usan 50 µl de una solución de 1 µg/ml de anticuerpo kappa anti-humano de cabra (UNLB, Southern Biotech 2060-01) en tampón de bicarbonato sódico 50 mM, pH 8,0 para revestir cada pocillo de una placa de microtitulación de unión elevada (Greiner EK 20061). Los pocillos se aspiran y se lavan con PBST (PBS, Tween al 0,1 %) y a continuación se bloquean durante 1 hora con PBST-BSA (PBS, BSA al 1 %, Tween al 0,1 %). Los pocillos se lavan a continuación de nuevo con PBST. Todas las etapas del ensayo se realizan a temperatura ambiente. Las valoraciones del anticuerpo anti-miostatina optimizado con humanizado (anticuerpo de longitud completa que comprende una región de Fc de IgG4, expresado de forma transitoria en 293 células), diluido en PBST-BSA comenzando en 50 ng/pocillo se añaden a los pocillos y la placa se incuba adicionalmente durante 1 h, se lava tal como anteriormente y se sondea con 50 µl del péptido biotinilado que se ha descrito anteriormente a una concentración de 50 nM (diluido en PBST-BSA). A continuación, se añaden 50 µl de un NeutrAvidina-AP de 2 µg/ml (1:1000 en PBST-BSA, Pierce 31002) y la detección se consigue mediante la adición de sustrato de AP de

acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce 31002). Se usa tampón solo como un control. La Absorbancia se lee a 560 nm. Los Fab 510C2 y C12 se unen al péptido con valores de Cl_{50} de 6,73 y 5,42 ng/pocillo respectivamente.

5 Los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a un péptido que consiste en los aminoácidos 40-64 (SEC ID N°: 53) de la miostatina madura y/o un péptido que consiste en los aminoácidos 43-57 (SEC ID N°: 62) de la miostatina madura (con un aminoácido cisteína o serina en la posición 47). Sin embargo, los anticuerpos de la invención no son capaces de unirse (a niveles significativamente mayores que el fondo), a péptidos que consisten en los aminoácidos 60-73, 74-86, 87-97, 96-108, 16-29, 1-15 o 30-42 de la miostatina madura. El anticuerpo murino denominado Mab 3 (véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 60/559.621 y N° 60/555.456 que se incorporan en el presente documento), que comprende regiones variables de murino (véanse las Figs 10 y 11) unido de forma operativa a la región Fc de IgG1 murino – no se unía péptidos que consisten en los aminoácidos 60-73, 74-86, 87-97, 96-108, 16-29, 1-15 o 30-42 de la miostatina madura y es el anticuerpo precursor para los anticuerpos de la invención.

15 Los anticuerpos humanizados 510C2 y C12 se unen a péptidos que consisten en dos aminoácidos 43-57 y 45-59 de la miostatina madura (tal como se muestra en la Tabla 1 que sigue a continuación) en un grado similar. Esto demuestra que el epítipo de la invención se localiza de forma más específica dentro del péptido que abarca los aminoácidos 45-57 de la miostatina madura. La unión se reduce ligeramente cuando los anticuerpos se someten a ensayo para la unión a un péptido que consiste en los aminoácidos 47-61 de la miostatina madura, lo que demuestra la importancia de los aminoácidos 45-46 de la miostatina madura para la unión o para la conservación de la conformación del péptido que permite la unión. La unión se reduce adicionalmente cuando los anticuerpos se someten a ensayo para la unión a un péptido que consiste en los aminoácidos 49-63 de la miostatina madura, lo que demuestra la importancia de los aminoácidos 47-48 de la miostatina madura para la unión o para la conservación de la conformación del péptido que permite la unión. La unión se reduce a niveles de fondo cuando los anticuerpos se someten a ensayo para la unión a un péptido que consiste en los aminoácidos 39-53 de la miostatina madura, lo que sugiere la importancia de la región de los restos 54-57.

Tabla 1

Péptido	Restos	Unión Relativa	Sec id N°:
ANYCSGECEVFVLQKYPHTLHVHQA	40-64	+++	53
CSGES*EFVFLQKYPH	43-57	+++	62
GECEVFVLQKYPHTH	45-59	+++	92.
GEVFVLQKYPHTLV	47-61	++	93
FVFLQKYPHTLHVHQ	49-63	+	94
KANYCSGECEVFVLQ	39-53	-	95

(*el resto es C en la miostatina)

C. Ensayo de ELISA de Mab Humanizado-Optimizado de Miostatina

30 Los anticuerpos 510C2 y C12 monoclonales de longitud completa de miostatina anti-humana humanizada se someten a ensayo en un ensayo de ELISA, en el que se mide la unión del anticuerpo al antígeno GDF-8 revestido en una placa. También se somete a ensayos la reactividad cruzada de los Mab con GDF-11. Como controles negativos se usan una condición sin Mab, un anticuerpo de control de isotipo, y una proteína irrelevante (HGF).

35 Cada pocillo de placas de 96 pocillos se reviste con 70 μ l de GDF-8 humano (libre de vehículo, 1 μ g/ml en tampón de carbonato, pH 9,6), GDF-11 humano recombinante (de Peprotech, Inc., N° de catálogo 120-11, libre de vehículo, 1 μ g/ml en tampón de carbonato, pH 9,6), o HGF humano recombinante (de R&D Systems, N° de catálogo 294-HG/CF, libre de vehículo, 1 μ g/ml en tampón de carbonato, pH 9,6). Las placas se incuban a 4 °C durante una noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con tampón de lavado (Tris (hidroximetil) aminometano 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,1 %). Las placas se bloquean con 200 μ l de tampón del bloqueo por pocillo (Leche Instantánea de Carnation al 5 % en el tampón de lavado anterior) durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces con tampón de lavado.

40 Los Mab se diluyen en tampón de bloqueo a 1 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,04 μ g/ml, 0,008 μ g/ml, 0,0016 μ g/ml, y 0,00032 μ g/ml. se usó un control sin Mab, que consiste solamente en tampón de bloqueo. También se usa un anticuerpo de control de isotipo como un control negativo, a 1 μ g/ml. A continuación se añaden 50 μ l de cada solución de Mab a los pocillos revestidos por duplicado con GDF-8 y GDF-11. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con tampón de lavado.

45 A continuación se añaden 50 μ l de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP de IgG anti-humana de

cabra, fragmento gamma de Fc específico, Jackson ImmunoResearch, N° de catálogo 109-035-008), diluido a 1:2000 en tampón de bloqueo, a cada pocillo y se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con tampón de lavado. A continuación se añaden 50 µl de sustrato cromogénico (es decir, sustrato de OPD) a cada pocillo y se permite que se desarrolle a temperatura ambiente durante 2,5 minutos. La reacción se detiene mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N a cada pocillo. La Absorbancia de los pocillos se lee a 490 nm. Se determina la absorbancia media de los pocillos duplicados, y estos valores se enumeran en la Tabla 2, que sigue a continuación.

Estos datos demuestran que los Mab 510C2 y C12 se unen a la miostatina unida a placa. Con respecto a la especificidad, estos Mab se unen preferentemente a GDF-8 sobre GDF-11. El Mab 510C2 muestra una unión de aproximadamente 25 veces superior a la miostatina (GDF-8) que a GDF-11. El Mab C12 muestra una unión de aproximadamente 5 veces superior a la miostatina que a GDF-11.

Tabla 2

	510C2	510C2	510C2	C12	C12	C12
	GDF-8	GDF-11	HGF	GDF-8	GDF-11	HGF
1 ug/ml	1,62275	0,67645	0,0723	1,5785	1,3021	0,0665
0,2 ug/ml	1,20585	0,24605	0,071	1,37095	0,87605	0,0543
0,04 ug/ml	0,55695	0,11485	0,07525	0,8177	0,34495	0,0564
0,008 ug/ml	0,2482	0,09125	0,07105	0,32805	0,11915	0,0507
0,0016 ug/ml	0,11425	0,09385	0,07255	0,1257	0,07	0,058
0,00032 ug/ml	0,0876	0,08245	0,0722	0,07415	0,05475	0,0554
sin Mab	0,08645	0,0936	0,0721	0,0544	0,05185	0,0522
Control de isotipo	0,09075	0,0919	0,0804	0,05185	0,0487	0,049

Además, en un ensayo de ELISA se demostró que el mab C12 de longitud completa no se une a otros miembros BMP-2, BMP-3, BMP-3b/GDF-10, BMP-4, BMP-7, BMP-8B, Activina A, Activina B, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2 y GDF-3 de la superfamilia de TGF- β ; demuestra una unión mínima a BMP-5. Se contempla que otros anticuerpos anti-miostatina de la invención del mismo modo no se unen o se unen de forma mínima a estos otros miembros de la superfamilia de TGF- β .

Ejemplo 3 Ensayo de Neutralización de Miostatina

Se retiran explantes ectodérmicos de embriones de Xenopus en el estadio de 8-9 blástulas mediante procedimientos convencionales y se cultivan en 0,5X de MBS (1X de MBS: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,7 mM, MgSO₄ 1 mM, HEPES 5 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, gentamicina a 1:1000 en v/v, albúmina de suero bovino al 0,1 %) con la adición de factor de crecimiento (GDF8 o GDF11) más o indicado, durante 18 horas a 18 °C, momento hacia el que el control de los embriones alcanza la etapa de neurula temprana (estadio 15-16). Los explantes se fotografían y se mide la longitud de cada explante usando un algoritmo para análisis de imágenes diseñado para cuantificación de protección animal. Los explantes no tratados ni con factor de crecimiento ni Fab (controles), se redondean en bolas de epidermis. La miostatina y GDF-11 inducen mesodermo en estos explantes ectodérmicos que hacen que los explantes se alarguen y formen estructuras de tipo mancuerna. Se añaden anticuerpos o Fab, cuando se someten a ensayo para actividad de neutralización, al medio de cultivo que contiene miostatina para toda la duración del periodo de cultivo y se evalúa su capacidad para inhibir movimientos de elongación inducidos por factor de crecimiento. Se añade miostatina a los explantes a 25 ng/ml. Se añaden anticuerpos o Fab a someter a ensayo a 20 µg/ml. Como control se usa un Fab generado para un antígeno irrelevante. Un anticuerpo GDF8 de anti-ratón monoclonal disponible en el mercado se puede someter a ensayo como un control, este anticuerpo se produce en cabras inmunizadas con GDF8 de ratón purificado y el fabricante demuestra que neutraliza la elongación de protecciones animales de Xenopus provocadas con 25 ng/ml de GDF8 murino cuando está presente aproximadamente 10-20 µg/ml (R&D Systems N° de Cat. MAB788).

Para el procesamiento de imágenes se usa ImagePro (v4.5.1.22, de Media Cybernetics). Se escribe una macro para automatizar el procesamiento de imágenes. La macro procesa la imagen y registra la longitud en unidades de bits. Se pueden usar procedimientos de medida alternativos tal como se conoce en la técnica. Se contempla que los anticuerpos de la invención neutralizan la actividad de GDF8 en el ensayo de protección animal y no presentan actividad de neutralización de GDF-11.

Ejemplo 4: Medidas de Afinidad de los Fab

La afinidad (K_D) y las tasas k_{on} y k_{off} de los Fab anti-miostatina de la presente invención se miden usando un instrumento 2000 de BIAcore[®] que contiene un chip sensor CM4. El BIAcore[®] usa las propiedades ópticas de resonancia de las plasmones superficiales para detectar alteraciones en la concentración de proteínas de las moléculas que interactúan dentro de una matriz de biosensor de dextrano. Excepto cuando se indica, todos los reactivos y materiales se adquieren en BIAcore[®] AB (Upsala, Suecia). Todas las medidas se realizan a 25 °C. Las muestras que contienen los Fab se disuelven en tampón de HBS-EP (cloruro sódico 150 mM, EDTA 3 mM, tensoactivo P-20 al 0,05 % (p/v), y HEPES 10 mM, pH 7,4). La miostatina o el GDF-11 (R&D Systems) se inmoviliza en células de flujo de un chip CM4 usando química de acoplamiento de amina. Las células de flujo (1-4) se activan con una mezcla a 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M a un caudal de 20 μ l/min. La miostatina o el GDF-11 (2,5 μ g/ml en acetato sódico 10 mM, pH 4,5) se inyecta manualmente sobre células de flujo a un caudal de 10 μ l/min. La densidad de superficie se controla y hasta que cada célula de flujo alcanza una densidad de superficie de \sim 150 unidades de respuesta (RU). Las superficies se bloquean con una inyección de 50 μ l de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5 (10 μ l/min). Para asegurar la retirada completa de cualquier miostatina o GDF-11 no unido covalentemente, se inyectan dos veces 15 μ l de glicina 10 mM, pH 1,5. El tampón de desarrollo usado para los experimentos genéticos contenía HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005 %.

La recogida de datos cinéticos de unión se realiza en caudal máximo (100 μ l/min). Cada ciclo de análisis consiste en (i) inyección de 250 μ l de un Fab (intervalo de concentraciones de 50 nM a 0,4 nM en incrementos de dilución de 2 veces) sobre todas las células de flujo 4 con la célula de flujo 1 como la célula de referencia, (ii) 20 min de disociación (flujo de tampón), (iii) regeneración de la superficie de GDF-8 o GDF-11 con dos inyecciones de 15 μ l de glicina 10 mM, pH 1,5, (iv) una inyección de blanco de 15 μ l de tampón de desarrollo, y (v) un período de estabilización de 2 min antes de comenzar el ciclo siguiente. La señal se controla como célula de flujo 2 menos célula de flujo 1, célula de flujo 3 menos célula de flujo 1 y célula de flujo 4 menos célula de flujo 1. Las muestras y un blanco de tampón se inyectan por duplicado en un orden aleatorio. Los datos se procesan usando el software SCRUBBER (Centro de Análisis de Interacción Biomolecular, Univ. de Utah). Las tasas de asociación y disociación para cada ciclo se determinan ajustando los datos del biosensor que usa un modelo de asociación sencilla usando ClampXP (Centro de Análisis de Interacción Biomolecular, Univ. de Utah) para extraer las constantes de tasa de k_{on} y k_{off} , la constante de unión en equilibrio K_d se calcula usando la relación $K_d = k_{off}/k_{on}$. Los datos de afinidad medidos para la unión de miostatina al Fab 510C2 son: k_{on} de $5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, k_{off} de $4,67 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, y K_d (calc) de 0,87 nM. No se observa unión a GDF-11 mediante el Fab 510C2.

Ejemplo 5: Medidas de Afinidad de los Mab

Las medidas de afinidad de unión para anticuerpos monoclonales de longitud completa de la invención se determinan usando un ensayo de KINEXA de Sapidynne. Perlas de sepharose de flujo rápido activadas con NHS (GE Healthcare) se revisten previamente con un anticuerpo de la invención (50 μ g de anticuerpo anti-miostatina por ml de perlas) y se bloquean con 10 mg/ml de BSA en Tris-HCl 1 M, pH 8,0. A continuación se incuban 20 pM y 50 pM de un anticuerpo de la invención con varias concentraciones (por ejemplo, diluciones en serie de 2,4 pM a 20 nM) de miostatina en tampón de desarrollo (PBS, Tween-20 al 0,005 % (v/v), 1 mg/ml de ovoalbúmina) durante 10 horas a temperatura ambiente. Para determinar el anticuerpo libre presente en equilibrio, cada muestra se pasa a través de las perlas revestidas con miostatina. La cantidad de anticuerpo unido a perla se cuantifica a continuación pasando una solución de anticuerpo Fc anti-humano de cabra marcado con fluorescencia (Cy5) (Jackson Immuno Research) diluido a 1:4000 en tampón de desarrollo sobre las perlas. La señal de fluorescencia medida es proporcional a la concentración de anticuerpo libre en equilibrio. Cada concentración de miostatina se mide por duplicado. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se obtiene a partir de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio, de curva múltiple (software KINEXA) y los datos se presentan con intervalos de confianza de un 95 % (IC).

La constante de la tasa de asociación (k_{on}) para la unión de GDF-8 también se determina usando un ensayo KINEXA de Sapidynne. Se mezclan veinte pM de anticuerpo con GDF-8 1 nM usando las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. En diversos puntos temporales, las muestras se investigan para anticuerpo libre usando las condiciones que se han descrito anteriormente para la unión en equilibrio, la continuación la dependencia del tiempo resultante se ajusta usando el software KINEXA para determinar la tasa de asociación (k_{on}). La constante de la tasa de disociación (k_{off}) se calcula usando la expresión $k_{off} = K_D \times k_{on}$. Cuando se miden 510C2 y C12 de longitud completa (unidos de forma operativa a una región de Fc de IgG₄) usando el ensayo descrito, los resultados son tal como se indica en la Tabla 3 que sigue a continuación.

Tabla 3

Mab	Kd, pM (CI al 95 %)	k_{on} , M ⁻¹ , s ⁻¹ (CI al 95 %)	k_{off} , s ⁻¹ , calculado
510C2	80 (41-134)	$1,38 \times 10^5$ ($1,08$ - $1,75 \times 10^5$)	$1,11 \times 10^{-5}$
C12	108 (23-294)	$7,42 \times 10^4$ ($6,83$ - $8,01 \times 10^4$)	$8,02 \times 10^{-5}$

Ejemplo 6 Ensayo Indicador de Miostatina/SBE

En este ensayo indicador, un plásmido que codifica un gen indicador, es decir, gen de luciferasa, corriente debajo de un elemento de unión a SMAD ("SBE"), más específicamente (CAGA)₁₂ expresa proteína de luciferasa cuando una molécula tal como miostatina, GDF-11, u otro miembro de la superfamilia de TGF- β se une a su propio receptor, desencadenando de ese modo la señalización de SMAD que da como resultado un complejo de SMAD fosforilado que es capaz de unirse al SBE. Anteriormente se informó que la secuencia CAGA era una secuencia de sensible a TGF- β dentro del promotor del gen PAI-1 inducido por TGF- β (Denner y col., EMBO J., 17: 3091-3100, 1998). La cantidad de miostatina activa expuesta a las células es directamente proporcional a la cantidad de enzima luciferasa producida que es directamente proporcional a la cantidad de luz producida y que se puede medir. La presencia de un inhibidor (por ejemplo, un anticuerpo que se une a la miostatina) reduce la cantidad de miostatina capaz de activar el SBE que por último da como resultado una producción de luz reducida. Este ensayo también se describe en la Publicación Internacional Número WO 2004/037861 que se incorpora en el presente documento.

Se contempla que un Ensayo Indicador de Miostatina/SBE no se limita a las condiciones exactas que se describen en el presente documento, y se pueden usar otros tipos de células, por ejemplo, 293HEK (ATCC) o células de Rabdomiosarcoma A204 (véase, por ejemplo, Whittemore, y col. BBRC, 200: 965-71, 2003); se pueden usar otros tipos de indicadores, por ejemplo, CAT, β -gal, GFP, y se pueden usar otras condiciones de crecimiento para las células y condiciones de ensayo que incluyen cantidades variables de miostatina en la reacción. Un experto en la materia será capaz rápidamente de discernir si un ensayo entra dentro del alcance de un ensayo indicador de miostatina/SBE para el que tendría un vector que comprende un elemento de SBE secuencia arriba de un gen indicado introducido en una célula huésped, en el que el elemento de SBE usado es sensible al SMAD producido como respuesta a la miostatina que se une al receptor de miostatina. R.S. Thies, y col., Growth Factors, 18: 251-259, 2001, describe un ensayo similar mientras que, Wittemore, L. y col., BBRC, 300: 965-971, 2003 describen la respuesta del elemento de SBE al SMAD producido como respuesta a la miostatina que se une a su receptor.

En este ensayo, se siembran células 293E (Edge Biosystems) en medios DMEM/F12 (3:1) (Gibco 93-0152DK), FBS al 10 %, Hepes 20 mM, L-glutamina 4 mM a aproximadamente 25000 células por pocillo en pocillos internos revestidos con poli-lisina de una placa de 96 pocillos (BD Biocoat 35-4461) y se incuban durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavan en PBS y se añaden 50 μ l de OptiMEM I (Gibco 31985-070) por pocillo. Las células se transfectan con 50 μ l de de la siguiente mezcla de SBE-ADN de luciferasa: (i) 80 μ l de Lipofectamina (Gibco 11668-019 combinada con 1,5 ml de OptiMEM y se permite que asiente durante 5 minutos y a continuación se añade a (ii) un tubo en el que se combinan 20 μ g de SBE ADN de luciferasa con 1,5 ml de OptiMEM y 200 μ l de reactivo Plus, se mezcla y se permite que asiente durante 5 minutos. Después de añadir las dos mezclas en conjunto, la solución se mezcla vigorosamente y se permite que repose durante 30 minutos antes de añadir 50 μ l a cada pocillo. A continuación las células se incuban durante una noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Para cada placa de células, se diluyen 5 ml de miostatina (R&D Systems 788-G8) a 20 ng/ml en medio completo. Cada anticuerpo de la invención a someter a ensayo se valora en medio completo, por ejemplo, de aproximadamente 40 μ g/ml a aproximadamente 50 ng/ml. Los medios de transfección se retiran de los pocillos y se añaden 50 μ l de una dilución de anticuerpo por pocillo y se añaden 50 μ l de de GDF-8 (miostatina) o GDF-11 (R&D Systems) por pocillo. La placa de células se incuban a continuación durante una noche a 37 °C en CO₂ al 5%. Al día siguiente, los medios se aspiran, las células se lavan en PBS y se añaden 75 μ l de tampón de lisis (Promega E266A). La actividad de luciferasa en el lisado celular se mide usando Reactivo de Luciferasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega E2620). La luminescencia se representa frente a la concentración Log₁₀ de Mab (μ g/ml) y se calcula la CI₅₀ para cada Mab para miostatina y GDF-11.

Cuando los anticuerpos monoclonales 510C2, C12 se someten a ensayo en estas condiciones con GDF-8, proporcionan valores de CI₅₀ (a partir de una media de dos ensayos) de 5,15 nM (5,74 y 4,57 nM) y 16,07 nM (23,04 y 9,12 nM) respectivamente. Ni los mAb 510C2 ni C12 demuestran actividad de neutralización en este ensayo cuando se someten a ensayo con GDF-11 en lugar de GDF-8.

Ejemplo 7 Farmacocinética

La farmacocinética (PK) de los anticuerpos de la invención se puede evaluar en ratones C57B6/SCID a una dosis de 1 mg/kg después de una sola administración intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP). Los animales reciben una mezcla de anticuerpo sin marcar y marcado con ¹²⁵I a una dosis que se ha descrito anteriormente y la concentración en suero se determina en base a la radiactividad de ¹²⁵I en el suero y la actividad específica de la dosis inyectada. Se representa la concentración en suero del anticuerpo administrado por IV o IP frente al tiempo.

Ejemplo 8 Efecto *in vivo* en la Masa y Fuerza Muscular

Para determinar si un anticuerpo de la invención bloquea la actividad de la miostatina *in vivo*, un anticuerpo de la invención se puede someter a ensayo en ratones SCID adultos. Los ratones SCID padecen una inmunodeficiencia combinada, y por lo tanto no generan ninguna reacción inmunológica después de la inyección de un anticuerpo de la invención. La masa muscular se usa como un indicador de la actividad de la miostatina en ratones tratados con un anticuerpo de la invención.

Se pesan ratones C57B6 SCID macho de ocho semanas de edad y se distribuyen uniformemente con respecto al peso corporal en grupos de ocho. Un anticuerpo de la invención en tampón PBS se inyecta en los ratones por vía IP a diversas dosis (por ejemplo, 60, 10,5 y 1 mg/kg) semanalmente. Los ratones tratados con PBS o sin tratar se usan como controles. Los tratamientos continúan durante 4-12 semanas. La masa muscular se evalúa mediante disección y pesando los músculos gastrocnemio y cuádriceps después del tratamiento.

Para determinar la fuerza muscular, se mide la fuerza de las extremidades delanteras con un medidor de ensayo de fuerza de agarre (por ejemplo, el modelo 1027 csx, Columbus Instruments).

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Eli Lilly and company
<120> Anticuerpos anti-miostatina
<130> X-17158
15 <140> US 60/726.062
<141> 12-10-2005
<150> US 60/725.235
20 <151> 11-10-2005
<150> US 60/724.670
<151> 06-10-2005
25 <160> 87
<170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
30 <211> 375
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 1
35

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
 35 40 45
 Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
 85 90 95
 Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110
 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
 115 120 125
 Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Ovis* sp.

5

<400> 3

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

10

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

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

<210> 6

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 6

```

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 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
           20           25           30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Val Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65           70           75           80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Tyr Arg Asn Pro Leu Thr
           85           90           95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105
    
```

10

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

20

<400> 7

```

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 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
    
```


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

5 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 8

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

15 <210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

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

5 <210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

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

15 <210> 11
 <211> 106

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 11

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

10 <210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 12

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 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
 20 25 30

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

5 <210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13

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

15 <210> 14
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

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

5

<210> 15
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética

15

<400> 15

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

```

          50                      55                      60
Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65              70              75              80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85              90

Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp
          100              105              110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Val Ser Ser
          115              120
    
```

5 <210> 16
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 16

```

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1              5              10

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Trp Arg Lys Val
          20              25              30

Gly Ser Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
          35              40              45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
          50              55              60

Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65              70              75              80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85              90

Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp
          100              105              110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115              120
    
```

15 <210> 17
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 17

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

5 <210> 18
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

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

15

Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 19

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

15 <210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 20

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

<210> 21
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 21

Gln Leu 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 Phe Ser Leu Arg Arg Val
 20 25 30
 Gly Ser Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Arg Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

5

10

65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5
 <210> 22
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 22

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

15
 <210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 23

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

<210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 24

Gln Leu 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 Phe Ser Leu Arg Lys Val
 20 25 30
 Gly Ser Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Arg Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp
 100 105 110
 Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 25

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

15 <210> 26
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 26

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

5 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 27

10 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 28

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Ser His
 1 5 10

25 <210> 29
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 29

30

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

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 30

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Arg
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 31

Gln Gln Trp Tyr Arg Asn Pro Leu Thr
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 32

Gln Gln Trp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr
 1 5

5	<p><210> 33 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
	<p><220> <223> Construcción sintética</p>
10	<p><400> 33</p> <p style="text-align: center;">Gln Gln Trp Tyr Leu Asn Pro Leu Thr 1 5</p>
15	<p><210> 34 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
20	<p><220> <223> Construcción sintética -</p> <p><400> 34</p> <p style="text-align: center;">Gln Gln Trp Tyr Glu Asn Pro Leu Thr 1 5</p>
25	<p><210> 35 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
30	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 35</p> <p style="text-align: center;">Gln Gln Trp Tyr Phe Asn Pro Leu Thr 1 5</p>
35	<p><210> 36 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Mus</i> sp.</p>
40	<p><400> 36</p> <p style="text-align: center;">Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Ser Ser Val Ser 1 5 10</p>
45	<p><210> 37 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial</p>
50	<p><220> <223> Construcción sintética</p>
55	<p><400> 37</p>

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Arg Ser Val Ser
1 5 10

5
<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética
<400> 38

Gly Phe Ser Trp Arg Lys Val Gly Ser Ser Val Ser
1 5 10

15
<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 39

Gly Phe Ser Met Arg Lys Val Gly Ser Ser Val Ser
1 5 10

25
<210> 40
<211> 12
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética
35 <400> 40

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Ser Ser Ile Ser
1 5 10

40
<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 41

Gly Phe Ser Leu Arg Arg Val Gly Ser Ser Val Ser
1 5 10

50
<210> 42
<211> 12
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 42

Gly Phe Ser Leu Arg Met Val Gly Ser Ser Val Ser
1 5 10

10

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus* sp.

15

<400> 43

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn
1 5 10 15

20

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 44

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Leu Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn
1 5 10 15

30

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 45

40

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Leu Asn Pro Ser Leu Arg Asn
1 5 10 15

45

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 46

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Leu Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn

1 5 10 15

5 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 47

Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

20 <400> 48

Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 49

Arg Lys Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 50

45 **Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Met**
1 5 10

50 <210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 51

5

Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 52

<211> 7

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

15

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Val
1 5

<210> 53

<211> 25

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
20 25

25

<210> 54

<211> 124

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

30

<400> 54

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

100

105

110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 55
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 55

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

<210> 56
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 56

Gln Leu 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 Phe Ser Leu Arg Lys Val

Gln Gln Trp Tyr Xaa Asn Pro Leu Thr

1

5

5 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <220>
 <221> X
 <222> (4)..(4)
 <223> X es L, W o M

20 <220>
 <221> X
 <222> (6)..(6)
 <223> X es K, R o M

25 <220>
 <221> X
 <222> (9)..(9)
 <223> X es S o R

<400> 59

Gly Phe Ser Xaa Arg Xaa Val Gly Xaa Ser Val Ser
1 5 10

30 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Construcción sintética

40 <220>
 <221> X
 <222> (8)..(8)
 <223> X es K o L

45 <220>
 <221> X
 <222> (10)..(10)
 <223> X es Y o L

<400> 60

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Xaa Arg Xaa Asn Pro Ser Leu Arg Asn
1 5 10 15

50 <210> 61
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> Construcción sintética

10
 <220>
 <221> X
 <222> (2)..(2)
 <223> X es A o K

15
 <220>
 <221> X
 <222> (12)..(12)
 <223> X es M o F

20
 <220>
 <221> X
 <222> (14)..(14)
 <223> X es M o L
 <400> 61

25
Arg Xaa Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Xaa Asp Xaa
1 5 10

30
 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

35
Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His
1 5 10 15

40
 <210> 63
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*
 <400> 63

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

<210> 64
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 64

5

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

5
 <210> 65
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 65

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
 20

10
 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

20
 25
 <210> 67
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 67

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5
 <210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68

phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

10
 15
 <210> 69
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
 20

20
 25
 <210> 70
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

30
 35
 <210> 71
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40
 45
 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5
<210> 73
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

15
<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

20
<210> 75
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 75

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

30
<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35
<400> 76

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40
<210> 77
<211> 109
<212> PRT
<213> *Mus sp.*

45
<400> 77

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

<210> 78
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

5

<400> 78

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

10

<210> 79
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

15

<400> 79

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

5 <210> 80
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

10 <400> 80

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

15 <210> 81
 <211> 109

<212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 81

5

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

<210> 82
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

10

<400> 82

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

15

<210> 83

<211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

5 <400> 83

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

<210> 84
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

10

<400> 84

15

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

<210> 85

<211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

5 <400> 85

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

10 <210> 86
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

15 <400> 86

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

<210> 87
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 87

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

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-miostatina humanizado que comprende un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 10 y un polipéptido de la región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 26.
- 5 2. Un anticuerpo anti-miostatina humanizado que comprende un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 5 y un polipéptido de la región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 15.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.
4. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como un medicamento.
- 10 5. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento o prevención de una o más afecciones seleccionadas entre debilidad, caquexia, atrofia muscular, debilidad muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, EPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, diabetes de tipo II o síndrome metabólico.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

FIG. 1 Promiostatina

1	<u>MQKLQLCVYI</u>	<u>YLFMLIVAGP</u>	<u>VDLNENSEBQK</u>	ENVEKEGLCN	40
41	ACTWRQNTKS	SRIEAIKIQI	LSKLRLETAP	NISKDVIRQL	80
81	LPKAPPLREL	IDQYDVQRDD	SSDGSLEDDD	YHATTETIIT	120
121	MPTESDFLMQ	VDGKPKCCFF	KFSSKIQYNK	VVKAQLWIYL	160
161	RPVETPTTVF	VQILRLIKPM	KDTRYTGIR	SLKLDMPGT	200
201	GIWQSIDVKT	VLQNLKQPE	SNLGIKAL	DENGHDLAVT	240
241	FPGPGEDGLN	PFLEVKVTDI	PKRSRRDFGL	DCDEHSTESR	280
281	CCRYPLTVDF	EAFGWDWIIA	PKRYKANYCS	GECEFVFLQK	320
321	YPHTLVHQA	NPRGSAGPCC	TPTKMSPINM	LYFNGKEQII	360
361	<u>YGKIPAMVVD</u>	RCGCS 376	(SEC ID N°: 1)		

FIG. 2 Miostatina Madura (Humana, murina, rata, pollo, pavo, perro, caballo, cerdo)

1 DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA 40
41 NYCSGECEFV FLQKYPHTL VHQANPRGSA GPCCTPTKMS 80
81 PINMLYFNGK EQIIYGKIPA MVVDRCGCS 109 (SEC ID N°: 2)

FIG. 3 Miostatina Madura

			58
pollo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
perro	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
caballo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
oveja	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
vaca	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
cerdo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHTH		
		109	<u>SEC ID</u>
pollo	LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS		2
perro	LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS		2
caballo	LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS		2
oveja	LVHQANPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS		3
vaca	LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGEGQIIYGKIPAMVVDRCGCS		2
cerdo	LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS		2

FIG. 4 **Miostatina: Homología con GDF-11**

Miostatina **DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYK**
GDF-11 **NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYK**

Miostatina **ANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTK**
GDF-11 **ANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTK**

Miostatina **MSPINMLYFNGKEQI IYGKI PAMVVDRCGCS** **(SEC ID N°: 2)**
GDF-11 **MSPINMLYFNDKQOI IYGKI PGMVVDRCGCS** **(SEC ID N°: 4)**

FIG. 5 Regiones Variables de Cadena Pesada - Marco conservado: VH2-70:

IC7.1 (SEC ID N°: 13)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTTVTVSS

329D2 (SEC ID N°: 14)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

510C2 (SEC ID N°: 15)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKGSRVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

518H3 (SEC ID N°: 16)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSWRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

525D8 (SEC ID N°: 17)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDLRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

LC14 (SEC ID N°: 14)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

HC5 (SEC ID N°: 18)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSMRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

HC8 (SEC ID N°: 19)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSISWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

HC16 (SEC ID N°: 20)
QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRKITTIVIGGGTFDYWGQGTTVTVSS

VH2-70 FR1	(SEC ID N°: 69)	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFS
VH2-70 FR2	(SEC ID N°: 70)	WIRQPPGKALEWLA
VH2-70 FR3	(SEC ID N°: 71)	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
VH2-70 FR4	(SEC ID N°: 72)	WGQGTTVTVSS

FIG. 6 Regiones Variables de Cadena Pesada - Marco Conservado VH4-39

DM1 (SEC ID N°: 21)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRRV~~GSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM6 (SEC ID N°: 22)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRMV~~GSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRLNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM37 (SEC ID N°: 56)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRLNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM41 (SEC ID N°: 23)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDLRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM14 (SEC ID N°: 24)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDMWGQGLVTVSS

DM15 (SEC ID N°: 25)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDLWGQGLVTVSS

DM26 (SEC ID N°: 55)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM27 (SEC ID N°: 55)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM16 (SEC ID N°: 55)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM18 (SEC ID N°: 55)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

DM21 (SEC ID N°: 55)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRYNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGLVTVSS

C12 (SEC ID N°: 26)
 QLQLQESGPGVLV~~KPSETLSLTCTVSGFSLRK~~VGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRLNPSLRNRVTISVDTS
 KNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDLWGQGLVTVSS

VH4-39	FR1	(SEC ID N°: 73)	QLQLQESGPGVLV KPSETLSLTCTVS
VH4-39	FR2	(SEC ID N°: 74)	WIRQPPGKLEWIG
VH4-39	FR3	(SEC ID N°: 75)	RVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCAR
VH4-39	FR4	(SEC ID N°: 76)	WGQGLVTVSS

FIG. 7 Región Variable de Cadena Ligera - Marco conservado: O2

IC7.1 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

329D2 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

510C2 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

518H3 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

525D8 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

LC14 (SEC ID N°: 6)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAVGVPFRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

HC5 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

HC8 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

HC16 (SEC ID N°: 5)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGTKVEIK

O2 FR1	(SEC ID N°: 65)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
O2 FR2	(SEC ID N°: 66)	WYQQKPGKAPKLLIY
O2 FR3	(SEC ID N°: 67)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
O2 FR4	(SEC ID N°: 68)	FGGGTKVEIK

FIG. 8 Regiones Variables de Cadena Ligera - Marco conservado O2

DM1 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM6 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM37 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM41 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM14 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM15 (SEC ID N°: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM26 (SEC ID N°: 8)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYSHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM27 (SEC ID N°: 9)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYAHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYSNPLTFGGGKVEIK

DM16 (SEC ID N°: 10)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYLNPLTFGGGKVEIK

DM18 (SEC ID N°: 11)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYENPLTFGGGKVEIK

DM21 (SEC ID N°: 12)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYFNPLTFGGGKVEIK

C12 (SEC ID N°: 10)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCQQWYLNPLTFGGGKVEIK

FIG. 9

Nombre	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3
IC7.1	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID N°: 47)
329D2	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
510C2	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 37)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
518H3	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSWRKVGSSVS (SEC ID N°: 38)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
525D8	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDLRYNPSLRN (SEC ID N°: 44)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
LC14	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAV (SEQ ID NO:52)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
HC5	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID NO:30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSMRKVGSSVS (SEC ID N°: 39)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
HC8	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 40)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
HC16	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 31)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 49)
DM1	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 41)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM6	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRMVGSSVS (SEC ID N°: 42)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM37	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRLNPSLRN (SEC ID N°: 45)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM41	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDLRYNPSLRN (SEC ID N°: 46)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM14	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDM (SEC ID N°: 50)
DM15	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDL (SEC ID N°: 51)
DM26	SASSISYSH (SEC ID N°: 28)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)

FIG. 9 Continuación

DM27	SASSISYAH (SEC ID N°: 29)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYENPLT (SEC ID N°: 32)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIYWDKDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM16	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYLNPLT (SEC ID N°: 33)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIYWDKDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM18	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYENPLT (SEC ID N°: 34)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIYWDKDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
DM21	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYENPLT (SEC ID N°: 35)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIYWDKDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 43)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 48)
C12	SASSISYMH (SEC ID N°: 27)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYLNPLT (SEC ID N°: 33)	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 36)	HIYWDKDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 45)	RAITTVIGGGTFDL (SEC ID N°: 51)
Consenso	SASSISYXH X es S o A (SEC ID N°: 57)	DTSKLAR (SEC ID N°: 30)	QWYENPLT X es S, R, L, E o F (SEC ID N°: 58)	GFSLRKVGSSVS X1 es L, W o M X2 es K, R o M X3 es S o R (SEC ID N°: 59)	HIYWDKDKRYNPSLRN X1 es K o L X2 es Y o L (SEC ID N°: 60)	RAITTVIGGGT X ₃ DL X1 es A o K X2 es M o F X3 es M o L (SEC ID N°: 61)

FIG. 10 Figura 10 LCVR de Anticuerpos Precursores de Murino

<u>FAb</u>	1		<u>CDR1</u>	40
3	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
5	QVVLTLQSPAI	MSASLGEKVT	MTCSASSSVH	YMHWYQQKSG
7	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
8	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKSG
9	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKSG
10	QVVLTLQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
11	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
12	QVVLTLQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVY	YMHWYQQKSG
14	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKPG
15	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIN	YMHWYQQKSG

<u>FAb</u>	41	<u>CDR2</u>		80
3	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
5	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
7	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
8	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
9	TSPKRWIYDT	SKLASGVPVR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
10	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
11	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
12	ASPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
14	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
15	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE

<u>FAb</u>	81	<u>CDR3</u>		108
3	DAATYYCQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 77)
5	DAATYYCQW	SSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 78)
7	DAATYYCQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 77)
8	DAATYYCQW	SSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 79)
9	DAATYYCQW	SRNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 80)
10	DAATYYCQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 81)
11	DAATYYCQW	NSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 82)
12	DAATYYCQW	TYNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 83)
14	DAATYYCQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 84)
15	DAATYYCQW	NSNPLTFGGG	TKLELKRAD	(SEC ID N°: 85)

FIG. 11 HCVR de Anticuerpos Precursores de Murino

FAb	1	CDR1	40
3		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
5		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMSVSWIR	
7		QVTLK-SGPGILQSSQTLTTLTCSLSGFSLTSTSGMIVSWIR	
8		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
9		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSVSGFSLSTSGMSVSWIR	
10		QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
11		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
12		QVTLKESGPGMLQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
14		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
15		QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSLSGFSLRTSGMSVSWIR	
FAb	41	CDR2	80
3		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
5		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRRLTISKDTSRNQV	
7		QSSGRGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
8		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
9		QPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQV	
10		QSSGKGLEWLAHIYWDDDERYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
11		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
12		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
14		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
15		QSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLRNRLTISKDTLRNQV	
FAb	81	CDR3	
3		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
5		FLKITSVDTADTATYYCARRGITTVLGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
7		FLWISSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
8		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
9		FLKITSVDTADTATYYCARRAITTVLGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
10		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
11		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
12		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
14		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
15		FLKITSVGTADTATYYCARRAITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS	
3		(SEC ID N°: 86)	
5		(SEC ID N°: 29)	
7		(SEC ID N°: 87)	
8		(SEC ID N°: 86)	
9		(SEC ID N°: 54)	
10		(SEC ID N°: 63)	
11		(SEC ID N°: 86)	
12		(SEC ID N°: 64)	
14		(SEC ID N°: 86)	
15		(SEC ID N°: 86)	