

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 184**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007** **E 12154124 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016** **EP 2559705**

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

30 Prioridad:

08.09.2006 US 843430 P
17.08.2007 US 956653 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.01.2017

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 596 184 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-activina A y usos de los mismos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Muchos estados patológicos graves están acompañados por una afección conocida como caquexia, que hace referencia a la pérdida de masa celular corporal. La masa celular corporal (MCC) consiste en masa muscular, masa visceral y masa de células inmunitarias. La MCC es el componente corporal más activo del cuerpo humano, dando cuenta del 95 % de toda la actividad metabólica. Un 5 % de pérdida de MCC conduce a una morbilidad cambiada, pérdida de fuerza muscular, metabolismo alterado y riesgo de infección aumentado. Una pérdida del 40 % puede dar como resultado la muerte.

10 Los ejemplos de afecciones en que la caquexia desempeña un papel en la determinación del resultado clínico de la enfermedad subyacente cubren una serie de los problemas de salud principales actualmente. En caquexia reumatoide, los pacientes de artritis reumatoide (AR) pierden de 13 a 15 % de la MCC. Dos tercios de los pacientes de AR tienen caquexia, y esto da como resultado una mortalidad de 2 a 5 veces mayor. Otras afecciones relacionadas incluyen obesidad caquética reumatoide y caquexia hipercitoquinémica. La caquexia relacionada con el cáncer contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad, afectando también a la capacidad del paciente de tolerar terapias potencialmente salvavidas.

15 Debido al papel común de la activina A en una serie de enfermedades extendidas, todas las cuales tienen altas tasas de mortalidad, existe una necesidad largamente sentida en la materia de composiciones y métodos para prevenir o revertir la caquexia relacionada con la enfermedad. Dichas composiciones y métodos se proporcionan en la presente memoria.

20 Rabinovici *et al.* (*J. Clin. Endocrinol. Metab.* agosto de 1992; 75(2): 571-6) dan a conocer la producción de un anticuerpo de activina A en ratones usando activina A recombinante purificada. El anticuerpo monoclonal reaccionaba con el dímero de activina A, pero no había banda detectable con la subunidad monomérica.

25 Groome *et al.* (*Hybridoma*, abril de 1991; 10(2): 309-16) dan a conocer la preparación de anticuerpos monoclonales contra inhibina humana. Se acoplaron 7 péptidos de inhibina sintéticos con tuberculina y se usaron para inmunizar ratones. Solo uno de los péptidos, correspondiente a las secuencias 82-114 de la inhibina humana, daba consistentemente buenos títulos de anticuerpos cuando se usaba en un ELISA con inhibina bovina intacta.

30 R&D Systems ofrece a la venta un AcM de murino (IgG1) contra activina A humana, que se ha generado usando activina A humana recombinante, para la inmunización de ratones para uso en diversas aplicaciones, incluyendo ELISA, transferencia Western e inmunohistoquímica.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención está dirigida a un anticuerpo aislado, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una región de nudo de cisteína de activina A humana, abarcando dicha región los aminoácidos C11-S33 y los aminoácidos C81-E111 de la secuencia enunciada en la SEQ ID NO:225, e inhibe la unión de activina A humana a receptor de activina A humana, y a su uso en terapia. Se proporcionan también polinucleótidos que codifican el anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno de la invención, y vectores de expresión y células hospedadoras que comprenden los mismos. Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

La Figura 6 proporciona la masa de músculo gastrocnemio en un modelo de caquexia cancerosa Colon-26 en ratón CDF1 con y sin tratamiento con anticuerpo A1 anti-activina A 18 días después de la inoculación tumoral.

La Figura 7 muestra un modelo de activina A, con la región de unión a anticuerpo marcada con un círculo. K21, K103 y X94 hacen referencia a residuos de lisina en la posición 21 y 103 y a un residuo de tirosina en la posición 94.

La Figura 8 es una gráfica que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3 como se determinan usando KinExA. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación a partir de la regresión no lineal de curvas competitivas usando un modelo de unión homogénea de un sitio de curva dual usando el software KinExA.

La Figura 9 muestra regiones epitópicas que no se protegían de la degradación por la unión de los anticuerpos A1, A2 o A3.

La Figura 10 es una gráfica que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3 por activina A intacta (indicada por el lote 55), así como activina A que se escinde en el residuo de tirosina en la posición aminoacídica número 94 (indicado por el lote 38).

La Figura 11 es una gráfica que muestra las afinidades de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3, así como dos anticuerpos comercialmente disponibles para activina A o activina B, sobre las superficies de anticuerpos inmovilizados.

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a regiones de la activina A humana que contienen dominios de nudo de cisteína reconocidas por anticuerpos que se unen también a la activina A completa. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a activina A humana y bloquean o empeoran la unión de activina A humana a uno o más ligandos.

La presente invención está dirigida a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una región de nudo de cisteína de activina A humana, abarcando dicha región los aminoácidos C11-S33 y los aminoácidos C81-E111 de la secuencia enunciada en la SEQ ID NO:225, e inhibe la unión de activina A humana a receptor de activina A humana, y a su uso en terapia. Se proporcionan también polinucleótidos que codifican el anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno de la invención, y vectores de expresión y células hospedadoras que comprenden los mismos. Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de la invención.

La mortalidad por insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) está relacionada con la caquexia. En un estudio (Anker, S.D. y Coats, A.J. *Chest* 115: 836-847, 1999), un 16 % de una población ambulatoria de ICC no seleccionada era caquética. Este estado era predictivo de un pronóstico empeorado independiente de la edad, clasificación funcional de la enfermedad, fracción de eyección ventricular izquierda y consumo de oxígeno máximo. La mortalidad en la cohorte caquética era de un 50 % a los 18 meses.

Es una ruta común a la progresión de la enfermedad en cáncer, artritis reumatoide, insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardíaca congestiva y otras afecciones en que la caquexia es un factor la ruta de la activina A. La atrofia y debilidad muscular son comunes en muchos estados patológicos y afecciones incluyendo envejecimiento, caquexia por cáncer, sepsis, denervación, abandono, inactividad, quemaduras, síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH (SIDA), insuficiencia renal o cardíaca crónica, descarga/microgravedad y distrofias musculares. Las activinas e inhibinas son miembros de la superfamilia de TGF-beta. Las activinas e inhibinas funcionan como estimulantes e inhibidores, respectivamente, de la secreción y biosíntesis de la hormona estimulante de folículo pituitario (FSH). La activina A es la forma predominante de la activina. En la biología reproductiva, las activinas e inhibinas son reguladores importantes del ciclo ovárico y del proceso de ovulación, y pueden desempeñar un papel en la implantación del embrión y/o el mantenimiento del embarazo. (O'Connor *et al.*, *Human Reproduction*, V. 14, n° 3, 827-832, marzo de 1999; Draper *et al.*, *Endocrin.*, V. 138, n° 7: 3042-3046; Jones, *et al.*, *Endocrin.*, V. 147, n° 2: 724-732, febrero de 2006). La identificación de inhibinas y activinas en una amplia variedad de tejidos sugiere que estos factores desempeñan papeles mucho mayores que el control de la secreción de FSH.

Las activinas interactúan con dos clases estructuralmente relacionadas de receptores de serina/treonina cinasa (tipo I y tipo II). La inhibina antagoniza la activina al unirse al proteoglicano betaglicano, formando con él un complejo estable y secuestrando así los receptores de activina de tipo II, excluyendo los receptores de tipo I. Existen dos formas principales de activina: la activina A es un homodímero de subunidades β_A y la activina B es un homodímero de subunidades β_B . (Vale, *et al.*, *Recent. Prog. Horm. Res.*, V. 44: 1-34, 1988). Los heterodímeros de una subunidad α que es distinta de cualquier subunidad β dan como resultado la inhibina antagonista funcional.

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

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

Los niveles séricos de activina A en pacientes de insuficiencia cardíaca aumentaban según la gravedad de la enfermedad (Yndestad *et al.*, Circulation 109: 1379-1385, 2004). En un modelo de insuficiencia cardíaca en rata, la activina A sérica se elevó inmediatamente después del infarto de miocardio y persistió durante 6 meses, y la inmunotinción de activina A se localizaba únicamente en cardiomiocitos (Yndestad *et al.*, 2004). Se han reseñado niveles elevados de activina A en insuficiencia cardíaca (Yndestad, A. *et al.*, Circulation 109: 1379-1385, 2004).

Se proporcionan también ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-activina A o fragmento de anticuerpo de la invención, plásmidos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células o estirpes celulares que comprenden dichos ácidos nucleicos y/o vectores y plásmidos.

Se proporcionan también composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención y su uso en métodos para tratar una afección mediada por activina A, y para modular una actividad biológica de activina A *in vivo* o *in vitro*.

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas se indican usando abreviaturas estándares de una o tres letras. A menos que se indique otra cosa, las secuencias polipeptídicas tienen sus extremos amino a la izquierda y sus extremos carboxilo a la derecha, y las secuencias de ácido nucleico monocatenarias y la hebra superior de las secuencias de ácido nucleico bicatenarias tienen sus extremos 5' a la izquierda y sus extremos 3' a la derecha. Una secuencia polipeptídica o polinucleotídica particular puede describirse también explicando cómo difiere de una secuencia de referencia.

A menos que se indique otra cosa, se entiende que las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas incluyen cada ácido nucleico o aminoácido enumerado, respectivamente, así como los ácidos nucleicos o aminoácidos intermedios. Por ejemplo, la secuencia polipeptídica R13-Y39 expone una secuencia polipeptídica que incluye los aminoácidos R13 e Y39, así como los aminoácidos encontrados entre R13 e Y39 en la secuencia polipeptídica. Correspondientemente, la secuencia polipeptídica C1-T5 expone una secuencia polipeptídica que incluye los ácidos nucleicos C1 y T5, así como los ácidos nucleicos en posiciones 2, 3 y 4 de la secuencia. Por consiguiente, las denominaciones SEQ ID NO: 1-5 designan igualmente el grupo inclusivo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. Finalmente, los agrupamientos aminoácídicos se pretende también que sean inclusivos, a menos que se designe otra cosa. Por ejemplo, la frase "aminoácidos 1-5 de la SEQ ID NO: 28" incluye los aminoácidos en posiciones 1, 2, 3, 4 y 5 de la SEQ ID NO: 28.

Se muestran a continuación las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de dominios variables de cadena ligera y pesada particulares. Los anticuerpos que comprenden una cadena ligera y una cadena pesada se designan combinando el nombre de los dominios variables de la cadena ligera y el nombre de los dominios variables de la cadena pesada. Por ejemplo, "L4H7" indica un anticuerpo que comprende el dominio variable L4 de la cadena ligera y el dominio variable H7 de la cadena pesada.

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

Un anticuerpo puede comprender una cadena pesada o ligera específica, mientras que el dominio variable de cadena ligera o pesada complementario permanece sin especificar. En particular, ciertas realizaciones incluyen anticuerpos que se unen a un antígeno específico (tal como activina A) mediante una cadena ligera o pesada específica, de tal modo que la cadena pesada o ligera complementaria pueda ser indiscriminada, o incluso irrelevante, pero pueda determinarse, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias. Portolano *et al.*, J. Immunol. V. 150 (3), pág. 880-887 (1993); Clackson *et al.*, Nature V. 352 pág. 624-628 (1991).

A menos que se definan de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por los especialistas en la materia. Además, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán las pluralidades y los

términos plurales incluirán los singulares. Generalmente, la nomenclatura usada en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia. Los métodos y técnicas de la presente invención se efectúan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la materia y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa. Véanse, p.ej. Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates (1992) y Harlow and Lane "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se efectúan según las especificaciones del fabricante, como se logran comúnmente en la materia o como se describen en la presente memoria. La terminología usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y usados comúnmente en la materia. Pueden usarse técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y suministro farmacéuticos y tratamiento de pacientes.

Los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, se entenderá que tienen los siguientes significados:

El término "molécula aislada" (cuando la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) es una molécula que, en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con componentes asociados naturalmente que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente exenta de otras moléculas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no aparece en la naturaleza. Por tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, estará "aislada" de sus componentes asociados naturalmente. Una molécula puede volverse también sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la materia. La pureza u homogeneidad molecular puede ensayarse mediante una serie de medios bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la pureza de una muestra polipeptídica puede ensayarse usando electroforesis en gel de poliácridamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido, usando técnicas bien conocidas en la materia. Con ciertos fines, puede proporcionarse una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la materia para purificación.

Los términos "inhibidor de activina A" y "antagonista de activina A" se usan intercambiamente. Cada uno es una molécula que inhibe detectablemente al menos una función de la activina A. A la inversa, un "agonista de activina A" es una molécula que aumenta detectablemente al menos una función de la activina A. La inhibición causada por el inhibidor de activina A no tiene que ser completa, a condición de que sea detectable usando un ensayo. Puede usarse cualquier ensayo de una función de activina A, cuyos ejemplos se proporcionan en la presente memoria. Los ejemplos de funciones de activina A que pueden inhibirse por un inhibidor de activina A, o aumentarse por un agonista de activina A, incluyen la unión a activina A. Los ejemplos de tipos de inhibidores de activina A y agonistas de activina A incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de unión a activina A tales como proteínas de unión a antígeno (p.ej., proteínas de unión a antígeno inhibidoras de activina A), fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" hacen referencia cada uno a una molécula que comprende dos o más residuos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Estos términos engloban, p.ej., proteínas nativas y artificiales, fragmentos de proteína y análogos polipeptídicos (tales como muteínas, variantes y proteínas de fusión) de una secuencia proteica, así como proteínas modificadas postraduccionalmente o de otro modo covalente o no covalentemente. Un péptido, polipéptido o proteína puede ser monomérico o polimérico.

El término "fragmento polipeptídico" como se usa en la presente memoria hace referencia a un polipéptido que tiene una delección aminoterminal y/o carboxitterminal en comparación con la correspondiente proteína completa. Los fragmentos pueden ser, por ejemplo, de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud. Los fragmentos pueden ser también, por ejemplo, de como máximo 1.000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede comprender además, en cualquiera o ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína de origen natural diferente (p.ej., un Fc o dominio de cremallera de leucina) o una secuencia aminoácídica artificial (p.ej., una secuencia ligadora artificial).

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que se han modificado de cualquier manera y por cualquier razón, por ejemplo para: (1) reducir la sensibilidad a la proteólisis, (2) reducir la sensibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos proteicos y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Los análogos incluyen muteínas de un polipéptido. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones aminoácídicas únicas o múltiples (p.ej., sustituciones aminoácídicas conservativas) en la secuencia de origen natural (p.ej. en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman los contactos intermoleculares). Una "sustitución aminoácídica conservativa" es aquella que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (p.ej., un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper la hélice que aparece en la secuencia original, o desestabilizar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original o que son necesarias para su funcionalidad). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas

reconocidas en la materia en "Proteins, Structures and Molecular Principles" (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); "Introduction to Protein Structure" (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)) y Thornton *et al.* Nature 354: 105 (1991).

Una "variante" de un polipéptido (p.ej. un anticuerpo) comprende una secuencia aminoacídica en la que se insertan, se eliminan y/o se sustituyen uno o más residuos aminoacídicos en la secuencia aminoacídica respecto a la secuencia polipeptídica nativa, y que retiene esencialmente la misma actividad biológica que el polipéptido nativo. La actividad biológica del polipéptido puede medirse usando técnicas estándares en la materia (por ejemplo, si la variante es un anticuerpo, su actividad puede ensayarse mediante ensayos de unión como se describen en la presente memoria). Las variantes incluyen fragmentos, análogos, polipéptidos recombinantes, polipéptidos sintéticos y/o proteínas de fusión. Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (p.ej. un anticuerpo) que se ha modificado químicamente, p.ej., mediante conjugación con otro resto químico tal como, por ejemplo, polietilenglicol, albúmina (p.ej. seroalbúmina humana), fosforilación y glicosilación. A menos que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, cuyos ejemplos se describen a continuación.

Una "proteína de unión a antígeno" es una proteína que comprende una porción que se une a un antígeno y, opcionalmente, un andamiaje o porción estructural que permite a la porción de unión a antígeno adoptar una conformación que promueva la unión de la proteína de unión a antígeno al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (p.ej., una porción de unión a antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpo y análogos de anticuerpo. La proteína de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, un andamiaje de proteína alternativo o andamiaje artificial con CDR o derivados de CDR injertados. Dichos andamiajes incluyen, pero sin limitación, andamiajes derivados de anticuerpo que comprenden mutaciones introducidas, por ejemplo, para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión a antígeno, así como andamiajes totalmente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véanse, por ejemplo, Korndorfer *et al.*, 2003, "Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics", volumen 53, edición 1: 121-129; Roque *et al.*, 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654. Además, pueden usarse péptidos miméticos de anticuerpos ("PAM"), así como andamiajes basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como andamiaje.

Una proteína de unión a antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina de origen natural. Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina de origen natural, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento antigénico. La porción carboxiterminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada incluyendo también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en general, "Fundamental Immunology" Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión a antígeno, de tal modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión. Las cadenas de inmunoglobulina de origen natural exhiben la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Del extremo N al extremo C, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación NIH nº 91-3242, 1991.

Un "anticuerpo" hace referencia a una inmunoglobulina intacta o a una porción de unión a antígeno de la misma que compete con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique otra cosa. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio (dAb) y fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido.

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que tiene los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento divalente que tiene dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd tiene los dominios V_H y C_H1; un fragmento Fv tiene los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo y un fragmento dAb tiene un dominio V_H, un dominio V_L o un fragmento de unión a antígeno de un dominio V_H o V_L (patente de EE.UU. nº 6.846.634, 6.696.245, publicación de solicitud de EE.UU. nº 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989).

Un anticuerpo monocatenario (scFv) es un anticuerpo en que una región V_L y V_H se unen a través de un ligador (p.ej., una secuencia sintética de residuos aminoácidos) formando una cadena proteica continua en la que el ligador es suficientemente largo para permitir a la cadena proteica replegarse en sí misma y formar un sitio de unión a antígeno monovalente (véanse, p.ej., Bird *et al.*, 1988, *Science* 242: 423-26 y Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83). Los diacuerpos son anticuerpos divalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en los que cada cadena polipeptídica comprende los dominios V_H y V_L unidos por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, permitiendo por tanto que cada dominio se aparee con un dominio complementario de otra cadena polipeptídica (véanse, p.ej., Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-48 y Poljak *et al.*, 1994, *Structure* 2: 1121-23). Si las dos cadenas polipeptídicas de un diacuerpo son idénticas, entonces el diacuerpo resultante de su apareamiento tendrá dos sitios de unión a antígeno idénticos. Pueden usarse cadenas polipeptídicas que tienen diferentes secuencias para elaborar un diacuerpo con dos sitios de unión a antígeno diferentes. De forma similar, los tricuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones estructurales (FR) de un anticuerpo dado pueden identificarse usando el sistema descrito por Kabat *et al.* en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación NIH nº 91-3242, 1991. Pueden incorporarse una o más CDR a una molécula covalente o no covalentemente para hacerla una proteína de unión a antígeno. Una proteína de unión a antígeno puede incorporar la CDR o las CDR como parte de una cadena polipeptídica mayor, puede ligar covalentemente la CDR o las CDR con otra cadena polipeptídica o puede incorporar la CDR o las CDR no covalentemente. Las CDR permiten a la proteína de unión a antígeno unirse específicamente a un antígeno de interés particular.

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

El término "anticuerpo humano", al que se hace referencia también como "anticuerpo totalmente humano", incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización, todos los dominios variables y constantes derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo totalmente humano). Estos anticuerpos pueden prepararse en una variedad de modos, cuyos ejemplos se describen a continuación, incluyendo inmunización con un antígeno de interés de un ratón que está modificado genéticamente para expresar anticuerpos derivados de genes que codifican la cadena pesada y/o ligera humana.

Un anticuerpo humanizado tiene una secuencia que difiere de la secuencia de un anticuerpo derivada de una especie no humana en una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones aminoácidas, de tal modo que el anticuerpo humanizado es menos probable que induzca una respuesta inmunitaria y/o que induzca una respuesta inmunitaria menos grave, en comparación con el anticuerpo de especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, mutan ciertos aminoácidos de los dominios estructurales y constantes de las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo de especie no humana, produciendo el anticuerpo humanizado. En otra realización, se fusionan el dominio o dominios constantes de un anticuerpo humano con el dominio o dominios variables de una especie no humana. En otra realización, se cambian uno o más residuos aminoácidos en una o más secuencias de CDR de un anticuerpo no humano para reducir la probable inmunogenicidad del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en el que los residuos aminoácidos cambiados no son críticos para la unión inmuno-específica del anticuerpo a su antígeno, o los cambios en la secuencia aminoácida que se hacen son cambios conservativos, de tal modo que la unión del anticuerpo humanizado al antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano al antígeno. Pueden encontrarse ejemplos de cómo elaborar anticuerpos humanizados en las patentes de EE.UU. nº 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más de otros anticuerpos. En una realización, una o más de las CDR derivan de un anticuerpo anti-activina A humana. En otra realización, todas las CDR derivan de un anticuerpo anti-activina A humana. En otra realización, se mezclan las CDR de más de un anticuerpo anti-activina A humana y se emparejan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena pesada de un primer anticuerpo anti-activina A humana, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-activina A humana y las CDR de la cadena pesada de un tercer anticuerpo anti-activina A humana. Además, las regiones estructurales pueden derivar de uno de los mismos anticuerpos anti-activina A, de uno o más anticuerpos diferentes, tales como un anticuerpo humano o, de un anticuerpo humanizado. En un ejemplo de anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntico a, homólogo de, o derivado de un anticuerpo de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas a, homólogas de, o derivadas de un anticuerpo o anticuerpos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos de aquellos anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada (concretamente, la capacidad de unirse específicamente a activina A).

- Los fragmentos o análogos de anticuerpos pueden prepararse fácilmente por los especialistas en la materia siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva y usando técnicas bien conocidas en la materia. Los extremos aminoterminal y carboxiterninal preferidos de fragmentos o análogos aparecen cerca los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de secuencia nucleotídica y/o aminoácídica con las bases de datos de secuencia públicas o privadas. Pueden usarse métodos de comparación informatizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteína predichos que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Son conocidos métodos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, p.ej., Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253: 164.
- Adicionalmente, pueden producirse anticuerpos específicos de antígeno (concretamente, específicos de activina A) mediante métodos conocidos en la materia usando un dominio VL o VH específico para cribar una colección de dominios variables complementarios. Dichos métodos de producción de anticuerpos son conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de anticuerpo fusionados con otra proteína, tales como una proteína de cubierta minoritaria, para enriquecer el fago con antígeno. Entonces, usando una colección combinatoria aleatoria de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) redispuestas de ratones inmunes al antígeno (p.ej. activina A), se exhiben diversas colecciones de fragmentos de anticuerpo sobre la superficie del fago. En estas colecciones pueden cribarse los dominios variables complementarios y purificarse los dominios, por ejemplo, por columna de afinidad. Véase Clackson *et al.*, *Nature*, V. 352 pág. 624-628 (1991).
- En otro ejemplo, pueden usarse cadenas individuales VL o VH de un anticuerpo (concretamente, anticuerpo de activina A) para buscar otras cadenas VH o VL que podrían formar fragmentos de unión a antígeno (o Fab), con la misma especificidad. Por tanto, pueden expresarse combinaciones aleatorias de genes de Ig de cadena VH y VL como fragmentos de unión a antígeno en una colección de bacteriófago (tal como fd o fago lambda). Por ejemplo, puede generarse una colección combinatoria utilizando la colección de cadena VL o VH original combinada con colecciones de cadena VL o VH específicas de unión a antígeno, respectivamente. Las colecciones combinatorias pueden cribarse entonces por técnicas convencionales, usando por ejemplo una sonda marcada radiactivamente (tal como activina A marcada radiactivamente). Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* V. 150 (3) pág. 880-887 (1993).
- Un "anticuerpo injertado con CDR" es un anticuerpo que comprende una o más CDR derivadas de un anticuerpo de una especie o isotipo particular y la estructura de otro anticuerpo de la misma o diferente especie o isotipo.
- Un "anticuerpo multiespecífico" es un anticuerpo que reconoce más de un epítipo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo biespecífico", que reconoce dos epítipos distintos en el mismo o diferentes antígenos.
- Un "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno" o "sitio de unión a antígeno" es una porción de una proteína de unión a antígeno que contiene residuos aminoácídicos (u otros restos) que interaccionan con un antígeno y contribuyen a la especificidad de la proteína de unión a antígeno y la afinidad por el antígeno. Para un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno, esto incluirá al menos parte de al menos uno de sus dominios de CDR.
- Un "epítipo" es la porción de una molécula que se une a una proteína de unión a antígeno (p.ej., un anticuerpo). Un epítipo puede comprender porciones no contiguas de la molécula (p.ej., en un polipéptido, los residuos aminoácídicos que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están suficientemente cercanos entre sí para unirse a una proteína de unión a antígeno), e incluye los aminoácidos de secuencia terminales enumerados. Por ejemplo, la secuencia polipeptídica R13-Y39 incluye los aminoácidos R13 e Y39, así como los aminoácidos encontrados entre R13 e Y39 en la secuencia. En realizaciones en que el epítipo comprende porciones no contiguas de una molécula, las secuencias se observarán en consecuencia.
- La "identidad porcentual" de dos secuencias polinucleotídicas o dos secuencias polipeptídicas se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP (una parte del paquete GCG Wisconsin, versión 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) usando sus parámetros por defecto.
- Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan intercambiamente a lo largo de la memoria e incluyen moléculas de ADN (p.ej., ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (p.ej., ARNm), análogos de ADN o ARN generados usando análogos nucleotídicos (p.ej., ácidos peptidonucleicos y análogos nucleotídicos de origen no natural) e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria.
- Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender un marco abierto de lectura contiguo que codifica un anticuerpo o un fragmento de la invención.
- Dos polinucleótidos bicatenarios son "el complemento" entre sí si sus secuencias pueden alinearse en orientación antiparalela de tal modo que cada nucleótido de un polinucleótido enfrente a su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos desapareados en el extremo 5' o 3' de cualquier secuencia. Un polinucleótido es "complementario" de otro polinucleótido si los dos polinucleótidos pueden hibridar

entre sí en condiciones moderadamente rigurosas. Por tanto, un polinucleótido puede ser complementario de otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que puede usarse para introducir otro ácido nucleico ligado a él en una célula. Es un tipo de vector un "plásmido", que hace referencia a una molécula de ADN lineal o circular bicatenaria en la que pueden ligarse segmentos adicionales de ácido nucleico. Es otro tipo de vector un vector vírico (p.ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectivos de replicación), en el que pueden introducirse en el genoma vírico segmentos adicionales de ADN. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p.ej., vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras introducción en la célula hospedadora, y así se replican junto con el genoma hospedador. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

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

Una "célula hospedadora" es una célula que puede usarse para expresar un ácido nucleico, p.ej. un ácido nucleico de la invención. Una célula hospedadora puede ser procariótica, por ejemplo *E. coli*, o puede ser eucariótica, por ejemplo eucariótica de una célula (p.ej., una levadura u otro hongo), una célula vegetal (p.ej., una célula de planta de tabaco o tomate), una célula animal (p.ej., una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. El Ejemplo 3 de la presente memoria describía el uso de células CS-9. Los ejemplos de otras células hospedadoras incluyen la estirpe COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23: 175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como Veggie CHO y estirpes celulares relacionadas que crecen en medios libres de suero (véase Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), células HeLa, estirpes celulares BHK (ATCC CRL 10), la estirpe celular CV1/EBNA derivada de la estirpe celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (véase McMahan *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 2821), células de riñón embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras estirpes celulares de primate transformadas, células diploides normales, estirpes celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Típicamente, una célula hospedadora es una célula cultivada que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que puede expresarse entonces en la célula hospedadora. La frase "célula hospedadora recombinante" puede usarse para designar una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico para expresar. Una célula hospedadora puede ser también una célula que comprende el ácido nucleico pero no lo expresa al nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula hospedadora, de tal modo que se vuelva ligada operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula hospedadora hace referencia no solo a la célula en cuestión particular, sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. A causa de que pueden aparecer ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debidas, p.ej., a mutación o influencia ambiental, dicha progenie puede de hecho no ser idéntica a la célula original, pero sigue incluida dentro del alcance del término como se usa en la presente memoria.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención inhiben una actividad biológica de la activina A. Por ejemplo, pueden atenuar la caquexia, y esta actividad puede estar presente cuando el anticuerpo es totalmente humano, tal como un anticuerpo totalmente humano.

Un anticuerpo no tiene que inhibir completamente una actividad inducida por activina A para encontrar uso en la presente invención; en lugar de ello, se contemplan también para uso anticuerpos que reducen una actividad particular de activina A. (Las discusiones en la presente memoria de mecanismos particulares de acción para las proteínas de unión a antígeno de unión a activina A en el tratamiento de enfermedades particulares son solo ilustrativas, y los métodos presentados en la presente memoria no están así vinculados).

La presente divulgación proporciona proteínas de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo consistente en A1-A14 o una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo consistente en A1-A14, y fragmentos, derivados, muteínas y variantes de las mismas. Dicha proteína de unión a antígeno puede designarse usando la nomenclatura "LxHy", en la que "x" corresponde al número de la región variable de cadena ligera e "y" corresponde al número de la región variable de cadena pesada como están marcadas en las secuencias siguientes. Es decir, por ejemplo, que "A1HC" designa la región variable de cadena pesada del anticuerpo A1; "A1LC" designa la región variable de cadena ligera del anticuerpo A1 y demás. Hablando más en

general, "L2H1" hace referencia a una proteína de unión a antígeno con una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de L2 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de H1. Por claridad, todos los intervalos designados por al menos dos miembros de un grupo incluyen todos los miembros del grupo entre e incluyendo los miembros terminales del intervalo. Por tanto, el intervalo de grupo A1-A14 incluye todos los miembros entre A1 y A14, así como los miembros A1 y A14 mismos. El intervalo de grupo A4-A6 incluye los miembros A4, A5 y A6, etc.

Se muestran también a continuación las localizaciones de las CDR, o regiones determinantes de la complementariedad (sombreadas y subrayadas) que forman parte del sitio de unión a antígeno, mientras que las regiones estructurales (FR) son los segmentos intermedios de estas secuencias de dominio variable. Tanto en las regiones variables de cadena ligera como en las regiones variables de cadena pesada, hay tres CDR (CDR 1-3) y cuatro FR (FR 1-4). Las regiones CDR de cada cadena ligera y pesada se agrupan también por tipo de anticuerpo (A1, A2, A3, etc.). Las proteínas de unión a antígeno pueden incluir, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno que tienen una combinación de dominios variables de cadena ligera y cadena pesada seleccionados del grupo de combinaciones consistentes en L1H1 (anticuerpo A1), L2H2 (anticuerpo A2), L3H3 (anticuerpo A3), L4H4 (anticuerpo A4), L5H5 (anticuerpo A5), L6H6 (anticuerpo A6), L7H7 (anticuerpo A7), L8H8 (anticuerpo A8), L9H9 (anticuerpo A9), L10H10 (anticuerpo A10), L11H11 (anticuerpo A11), L12H12 (anticuerpo A12), L13H13 (anticuerpo A13) y L14H14 (anticuerpo A14).

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

A1 HC

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

A1 LC

TCCTATGAGGTGACTCAGGCACCCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGTGTTGGTATCAGCA
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAGCAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGAAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAAGGCGTGGGACA
GCAGCACTGCGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA (SEQ ID NO:1)

A2 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAAGTCGGAACCTGGAACCTACGACAACCTACTACTA
CGGTCTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCAG (SEQ ID

NO:18)

A2 LC

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

A3 HC

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGCCTGGCCAAACATAAAGCAAGATG
GAAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAATTCAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAGCAGCAGCTGGTACTACTACAACCTACGG
TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:34)

A3 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTGACAGCAA
AATACTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID
NO:33)

A4 HC

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCCGGCTACTATATCCACTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCTAACA
GTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGG
ACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGATTCGGGGGTATAGCAGCAGCTGGCACTTTGA
CTACTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:50)

5

A4 LC

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGATACAATA
TTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTG
GGTCTTTTCGGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAAGCA
CAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA
CTGCATGCAAGCTCTCCAAACTCCGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAG (SEQ ID NO:49)

A5 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGG
GAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTTCGAGTCACCATATCAGTAGACAC
GTCCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATAGCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCT
GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCATGCGCCCT (SEQ
ID NO:66)

10

A5 LC

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

A6 HC

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

A6 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTTGGTATCA
GCAGAGACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTACATCCAGTTTGCAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTAAGTTACTACTGTCAACAGAGTTA
CAGTATTTCCGCCCACTTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGAACAAA (SEQ ID
NO:81)

5 A7 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTGGTATGATG
GAAGTACTGAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGCACTGGCTCTACCACTACGGTATGG
ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:98)

A7 LC

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

A8 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGG
GAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGGCGAGTCACCATATCAGTAGACAC
GTCCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATAGCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:114)

10

A8 LC

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGG
CCACCATCACCTGCAAGTCCAGCCAGAGTATTTTATACAGCTCCAACAATAAGAA
GTATCTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGTTGATCATTTAC
TGGACATCTATGCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA
TTACTGTCAAGCAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAA (SEQ ID NO:113)

A9 HC

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAAGTCGGAAGTGGAACTACGACAATACTACTA
CGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
 NO:130)

A9 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
 TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATAATTTAGGCTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCA
 AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT
 CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTACAACCTTATTACTGTCTACAGCAT
AATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID
 NO:129)

A10 HC

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTG
 AAGATCTCCTGTCAAGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGG
 TGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTG
ACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGA
CAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATT
 ACTGTGCGAGACAAGGACTGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
 CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:146)

5

A10 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
 GCATCACCTGCTCTGGAGAAAAATGGGGAGAGAAAAATATGCTTGTGTTGGTATCAGC
 AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATACCAAGCGGCCCTC
CGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCATTTCTGGGAACACAGCCACTCTGACC
ATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTATTGTCAAGGCGTGGGAC
AGGAGCACTGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:145)

A11 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTG
 TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCTT
ACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGT
 TGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGAC
 ACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGCGCTTACGGTGACTATCGCGGCTGGTTCCGACC
CCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:162)

10

A11 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
 GCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATGGGGGATAAAATTTGCTTTCTGGTATCAGCT
 GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAACAAGCGGCCCTCA
 GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
 TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGCGGCTGACTTTTACTGTCAAGGCGTGGGACA
GCAGCACTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID
 NO:161)

A12 HL

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGCCTATGGCATGCACTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATG
GAAGTAATAAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTATCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGTTCGGAACCTGGAACCTACGACTCCTACCAATA
CGGTTTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID
 NO:178)

A12 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
 TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCT
CACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTGTGCAACTTATTATTGTCTACAGCAT
AATAGTTATACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID
 NO:177)

A13 HC

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
 AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
 TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGAGGATGGGATGGATCAGCGCTTACA
ATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACACATCAACGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGG
CCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:194)

A13 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
 GCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATIGGGGGGATAAAATATGTTTGTTGGTATCAGCA
 GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGAACTGGTCATCTATCTAGATAACAAGCGGCCCTCA
 GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
 TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGCGTGGGACA
GCAGCACGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTG (SEQ ID NO:193)

A14 HC

CAGGTTTCAGCTGGTGAATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
 AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGG
 TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCCCTTACA
ATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG
ACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGCGATCTGACGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGA
CCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO:210)

A14 LC

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCT
 CCATCACCTGCTCTGGAGATAAAATIGGGGGGATAAAATATGCTTTCTGGTATCAGCA
 GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCTTCTATCATGATACCAAGCGGCCCTCA
 GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
 TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATCACTGTACGGCGTGGGACA
GCAGCACGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAC (SEQ ID NO:209)

Regiones variables de cadena ligera de las secuencias aminoácidas de los anticuerpos A1-A14. Las regiones CDR están sombreadas y subrayadas; se hace referencia a los segmentos o regiones intermedias como estructurales (FR) en la presente memoria.

A1

SYEVTQAPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:9)

A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFTYYCLOHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:25)

A3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCRQONTYPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID
NO:41)

A4

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSTGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSFR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPCSFGQGTKLEIK (SEQ
ID NO:57)

A5

DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLVWYQQKPGQPPKLIYWTS
MRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:73)

A6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISNYLNWYQQRPGKAPKLLIYATSSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFVSYYCQQSYSISPTFGGGTKVENK (SEQ ID
NO:89)

A7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAGQGIRNDLVWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNTYPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID
NO:105)

A8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLVWYQQKPGQPPKLIYWTS
MRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:121)

A9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFTYYCLOHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:137)

A10

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEKWGEKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDTRKPSGIP
ERFSGSISGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:153)

A11

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQLKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDAADFYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:169)

A12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGSGTEFTLTISLQPEDCATYYCLQHNSYTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:185)

A13

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPELVIYLDNKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:201)

5 **A14**

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAEWYQQKPGQSPVLVIFYHDTKRPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHCQAWDSSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:217)

Regiones variables de cadena pesada de las secuencias aminoacídicas de los anticuerpos A1-A14. Las regiones CDR están sombreadas y subrayadas, se hace referencia a las demás regiones como estructurales (FR) en la presente memoria.

10 **A1**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIIPYN
GNTNSAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDRDYGVNYDAFDI
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:10)

A2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG
SNKYHADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNYDNYYYG
LDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26)

A3

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLECVANIKQDGS
EEYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSSSWYNYNYGMD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:42)

A4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYFCARDSGYSSSWHFDY
WGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO:58)

A5

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD SIAAPFDYWGQGTTLTV
SS (SEQ ID NO:74)

20 **A6**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGG
TNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR VQWLELAYFDYWGQ
TLTVTVSS (SEQ ID NO:90)

A7

QVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG
STEYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ERQWLYHYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:106)

A8

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKRRVTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDSDIAAPFDYWGQTLTV
SS (SEQ ID NO:122)

A9

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG
SNKYHADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNYDNYYYG
LDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:138)

5 **A10**

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSYGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIHYPGDS
DTRYSPSEQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCCARQGLGFDYWGQTLV
TVSS (SEQ ID NO:154)

A11

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYISYSGS
TYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARAYGDYRGWFDPWGQ
GTLTVTVSS (SEQ ID NO:170)

A12

10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSAYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSRNWNYDSYQY
GLDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:186)

A13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLERMGWISAYN
GNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYDSSGWG
HWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:202)

A14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPYN
GNTNYAQKFQGRVTMTTDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYDSSGWDP
WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:218)

15 Secuencias de consenso de CDR para los anticuerpos A1-A14.

Cadena ligera	Secuencia CDR1
L4	R S S Q S L L H S T G Y N - Y L D (SEQ ID NO:59)
<u>L5, L8</u>	<u>K S S Q S I L Y S S N N K K Y L V</u> (SEQ ID NO:75)
CONSENSO:	X ₁ S S Q S X ₂ L X ₃ S X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ Y L X ₉ (SEQ ID NO:115)

X₁ es un residuo de arginina o un residuo de lisina,
X₂ es un residuo de leucina o un residuo de isoleucina,
X₃ es un residuo de histidina o un residuo de tirosina,
X₄ es un residuo de treonina o un residuo de serina,
X₅ es un residuo de glicina o un residuo de asparagina,
X₆ es un residuo de tirosina o un residuo de asparagina,

X₇ es un residuo de asparagina o un residuo de lisina,

X₈ es un residuo de lisina o ningún residuo,

X₉ es un residuo de aspartato o un residuo de valina.

L2, L9	R A S Q G I R N N L G (SEQ ID NO:27)
L3, L12	R A S Q G I R N D L G (SEQ ID NO:43)
L6	R A S Q S I S N Y L N (SEQ ID NO:91)
<u>L7</u>	<u>R A G Q G I R N D L V</u> (SEQ ID NO:107)
CONSENSO:	R A X ₁₀ Q X ₁₁ I X ₁₂ N X ₁₃ L X ₁₄ (SEQ ID NO:116)

X₁₀ es un residuo de serina o un residuo de glicina,

X₁₁ es un residuo de serina o un residuo de glicina,

X₁₂ es un residuo de serina o un residuo de arginina,

X₁₃ es un residuo de tirosina, un residuo de aspartato o un residuo de asparagina,

X₁₄ es un residuo de aspartato, un residuo de valina o un residuo de glicina

L1	S G D K L G D K Y A C (SEQ ID NO:11)
L10	S G E K W G E K Y A C (SEQ ID NO:155)
L11	S G D K L G D K F A F (SEQ ID NO: 171)
L13	S G D K L G D K Y V C (SEQ ID NO:203)
<u>L14</u>	<u>S G D K L G D K Y A F</u> (SEQ ID NO:219)
CONSENSO:	S G X ₁₅ K X ₁₆ G X ₁₇ K X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ (SEQ ID NO:123)

X₁₅ es un residuo de glutamato o un residuo de aspartato.

X₁₆ es un residuo de triptófano o un residuo de leucina,

X₁₇ es un residuo de glutamato o un residuo de aspartato,

X₁₈ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina,

X₁₉ es un residuo de alanina o un residuo de valina,

X₂₀ es un residuo de cisteína o un residuo de fenilalanina

<u>Cadena ligera</u>	<u>Secuencia CDR2</u>
L2	A T S S L Q S (SEQ ID NO:28)
L3, L6, L7, L9, L12	A A S S L Q S (SEQ ID NO:44)
L5, L8	W T S M R E S (SEQ ID NO:76)
<u>L4</u>	<u>L G S F R A S</u> (SEQ ID NO:60)

<u>Cadena ligera</u>	<u>Secuencia CDR2</u>
CONSENSO:	X ₄₀ X ₄₁ SX ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ S (SEQ ID NO:124)

X₄₀ es un residuo de alanina, un residuo de triptófano o un residuo de leucina,
X₄₁ es un residuo de treonina, un residuo de alanina o un residuo de glicina,
X₄₂ es un residuo de serina, un residuo de metionina o un residuo de fenilalanina,
X₃ es un residuo de leucina o un residuo de arginina,
X₄₄ es un residuo de glutamina, un residuo de glutamato o un residuo de alanina,

L10	Q D T K R P S (SEQ ID NO:156)
L11	Q D N K R P S (SEQ ID NO:172)
L1	Q D S K R P S (SEQ ID NO:12)
L13	L D N K R P S (SEQ ID NO:204)
<u>L14</u>	<u>H D T K R P S</u> (SEQ ID NO:220)
CONSENSO:	X ₄₅ D X ₄₆ K R P S (SEQ ID NO: 128)

X₄₅ es un residuo de glutamina, un residuo de leucina o un residuo de histidina,
X₄₆ es un residuo de treonina, un residuo de asparagina o un residuo de serina

<u>Cadena ligera</u>	<u>Secuencia CDR3</u>
L1	Q A W D S S T A V (SEQ ID NO:13)
L10	Q A W D R S T - V (SEQ ID NO:157)
L11	Q A W D S S T V V (SEQ ID NO:173)
<u>L13L14</u>	<u>Q A W D S S T V -</u> (SEQ ID NO:205)
L2	L Q H N S Y P W T (SEQ ID NO:29)
L7	L Q H N T Y P F T (SEQ ID NO:109)
L9	L Q H N S Y P W T (SEQ ID NO:141)
<u>L12</u>	<u>L Q H N S Y T W T</u> (SEQ ID NO:189)
CONSENSO:	L Q H N X ₈₁ Y X ₈₂ X ₈₃ T (SEQ ID NO:131)

X₈₁ es un residuo de treonina o un residuo de serina,
X₈₂ es un residuo de prolina o un residuo de treonina,
X₈₃ es un residuo de fenilalanina o un residuo de triptófano

L3	R Q Q N T Y P L T (SEQ ID NO:45)
----	----------------------------------

L4	M Q A L Q T P C S (SEQ ID NO:61)
L5	Q Q Y Y S T P W T (SEQ ID NO:77)
L6	Q Q S Y S I S P T (SEQ ID NO:93)
<u>L8</u>	<u>Q Q Y Y S T P W T</u> (SEQ ID NO:125)
CONSENSO:	X ₇₃ QX ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ X ₈₀ (SEQ ID NO:132)

X₇₃ es un residuo de metionina, un residuo de glutamina o un residuo de arginina,
X₇₄ es un residuo de alanina, un residuo de tirosina, un residuo de glutamina o un residuo de serina,
X₇₅ es un residuo de leucina, un residuo de tirosina o un residuo de asparagina,
X₇₆ es un residuo de glutamina, un residuo de serina o un residuo de treonina,
X₇₇ es un residuo de treonina, un residuo de tirosina o un residuo de isoleucina,
X₇₈ es un residuo de prolina o un residuo de serina,
X₇₉ es un residuo de cisteína, un residuo de triptófano, un residuo de leucina o un residuo de prolina,
X₈₀ es un residuo de serina o un residuo de treonina

<u>Cadena pesada</u>	<u>Secuencia CDR1</u>
H5	G G S I N S - - F Y W S (SEQ ID NO:78)
H6	G G S F S A - - Y Y W S (SEQ ID NO:94)
H8	G G S I N S - - F Y W S (SEQ ID NO:126)
<u>H11</u>	<u>G G S I S S G G Y Y W S</u> (SEQ ID NO:174)
CONSENSO:	G G SX ₂₁ X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ YW S (SEQ ID NO:134)

X₂₁ es un residuo de isoleucina o un residuo de fenilalanina,
X₂₂ es un residuo de asparagina o un residuo de serina,
X₃ es un residuo de serina o un residuo de alanina,
X₂₄ es un residuo de glicina o ningún residuo,
X₂₅ es un residuo de glicina o ningún residuo,
X₂₆ es un residuo de fenilalanina o un residuo de tirosina,

H7	G F T F I S Y G M H (SEQ ID NO:110)
H4	G Y T F T G Y Y I H (SEQ ID NO:62)
H2, H9	G F T F S S Y G M H (SEQ ID NO:30)
<u>H10</u>	<u>G Y S F T S Y W I G</u> (SEQ ID NO:158)
CONSENSO:	G X ₂₇ X ₂₈ FX ₂₉ X ₃₀ YX ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ (SEQ ID NO:139)

X₂₇ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina,
X₂₈ es un residuo de treonina o un residuo de serina,
X₂₉ es un residuo de treonina, un residuo de serina o un residuo de isoleucina,
X₃₀ es un residuo de glicina o un residuo de serina,
X₃₁ es un residuo de tirosina, un residuo de glicina o un residuo de triptófano,
X₃₂ es un residuo de isoleucina o un residuo de metionina,
X₃₃ es un residuo de histidina o un residuo de glicina,

H13	G Y T F T S Y G L S (SEQ ID NO:206)
H12	G F T F S A Y G M H (SEQ ID NO:190)
H3	G F T F S S Y W M S (SEQ ID NO:46)
<u>H1, H14</u>	<u>G Y T F T S Y G I S</u> (SEQ ID NO:14)
CONSENSO:	GX ₃₄ TFX ₃₅ X ₃₆ YX ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ (SEQ ID NO:140)

X₃₄ es un residuo de tirosina o un residuo de fenilalanina,
X₃₅ es un residuo de treonina o un residuo de serina,
X₃₆ es un residuo de serina o un residuo de alanina,
X₃₇ es un residuo de glicina o un residuo de triptófano,
X₃₈ es un residuo de leucina, un residuo de metionina o un residuo de isoleucina,
X₃₉ es un residuo de serina o un residuo de histidina

<u>Cadena pesada</u>	<u>Secuencia CDR2</u>
H11	Y I S Y S G S T Y Y N P S L K S (SEQ ID NO:175)
H5	Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S (SEQ ID NO:79)
H6	E I N H S G G T N Y N P S L K S (SEQ ID NO:95)
<u>H8</u>	<u>Y I Y Y S G S T N Y N P S L K R</u> (SEQ ID NO:127)
CONSENSO:	X ₄₇ I X ₄₈ X ₄₉ S G X ₅₀ T X ₅₁ Y N P S L K X ₅₂ (SEQ ID NO:142)

X₄₇ es un residuo de tirosina o un residuo de glutamato,
X₄₈ es un residuo de serina, un residuo de tirosina o un residuo de asparagina,
X₄₉ es un residuo de tirosina o un residuo de histidina,
X₅₀ es un residuo de serina o un residuo de glicina,
X₅₁ es un residuo de tirosina o un residuo de asparagina,
X₅₂ es un residuo de serina o un residuo de arginina,

H2, H9	V I W Y D G S N K Y H A D S V K G (SEQ ID NO:31)
--------	--

H12	V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G (SEQ ID NO:191)
H3	N I K Q D G S E E Y Y V D S V K G (SEQ ID NO:47)
<u>H7</u>	<u>V I W Y D G S T E Y Y A D S V K G</u> (SEQ ID NO:111)
CONSENSO:	X ₅₃ I X ₅₄ X ₅₅ D G S X ₅₆ X ₅₇ Y X ₅₈ X ₅₉ D S V K G (SEQ ID NO:179)

X₅₃ es un residuo de asparagina o un residuo de valina,
X₅₄ es un residuo de triptófano o un residuo de lisina,
X₅₅ es un residuo de tirosina o un residuo de glutamina,
X₅₆ es un residuo de asparagina, un residuo de glutamato o un residuo de serina,
X₅₇ es un residuo de lisina o un residuo de glutamato,
X₅₈ es un residuo de histidina o un residuo de tirosina,
X₅₉ es un residuo de alanina o un residuo de valina,

H4	W I N P N S G G T N Y A Q K F Q G (SEQ ID NO:63)
H1	W I I P Y N G N T N S A Q K L Q G (SEQ ID NO:15)
H13	W I S A Y N G N T N Y A Q K F Q G (SEQ ID NO:207)
H14	W I S P Y N G N T N Y A Q K F Q G (SEQ ID NO:223)
<u>H10</u>	<u>I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G</u> (SEQ ID NO:159)
CONSENSO: N° 180)	X ₆₀ I X ₆₁ X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ T X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ X ₇₀ X ₇₁ X ₇₂ Q G (SEQ ID

X₆₀ es un residuo de triptófano o un residuo de isoleucina,
X₆₁ es un residuo de asparagina, un residuo de isoleucina, un residuo de serina o un residuo de tirosina,
X₆₂ es un residuo de prolina o un residuo de alanina,
X₆₃ es un residuo de asparagina, un residuo de tirosina o un residuo de glicina,
X₆₄ es un residuo de serina, un residuo de asparagina o un residuo de aspartato,
X₆₅ es un residuo de glicina o un residuo de serina,
X₆₆ es un residuo de glicina, un residuo de asparagina o un residuo de aspartato,
X₆₇ es un residuo de asparagina o un residuo de arginina,
X₆₈ es un residuo de tirosina o un residuo de serina,
X₆₉ es un residuo de alanina o un residuo de serina,
X₇₀ es un residuo de glutamina o un residuo de prolina,
X₇₁ es un residuo de lisina o un residuo de serina,
X₇₂ es un residuo de fenilalanina o un residuo de leucina

Cadena pesada	<u>Secuencia CDR3</u>
H5, H8	- - D S I A A P F D Y (SEQ ID NO:80)

Cadena pesada	Secuencia CDR3
H6	V Q W L E L A Y F D Y (SEQ ID NO:96)
H10	--- Q G L G F D Y (SEQ ID NO:160)
CONSENSO:	X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ X ₉₀ X ₉₁ X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ FDY (SEQ ID NO:187)

X₈₇ es un residuo de valina o ningún residuo,
X₈₈ es un residuo de glutamina o ningún residuo,
X₈₉ es un residuo de aspartato, un residuo de triptófano o ningún residuo,
X₉₀ es un residuo de serina, un residuo de leucina o ningún residuo,
X₉₁ es un residuo de isoleucina, un residuo de glutamato o un residuo de glutamina,
X₉₂ es un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de glicina,
X₉₃ es un residuo de alanina o un residuo de leucina,
X₉₄ es un residuo de prolina, un residuo de tirosina o un residuo de glicina,

H13	D Q D Y Y D S S G W - G H (SEQ ID NO:208)
H14	D Q D Y Y D S S G W - D P (SEQ ID NO:22)
H11	- - A Y G D Y R G W F D P (SEQ ID NO:176)
CONSENSO: N° 188)	X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ Y X ₉₈ D X ₉₉ X ₁₀₀ G W X ₁₀₁ X ₁₀₂ X ₁₀₃ (SEQ ID

X₉₅ es un residuo de aspartato o ningún residuo,
X₉₆ es un residuo de glutamina o ningún residuo,
X₉₇ es un residuo de aspartato o un residuo de alanina,
X₉₈ es un residuo de tirosina o un residuo de glicina,
X₉₉ es un residuo de serina o un residuo de tirosina,
X₁₀₀ es un residuo de serina o un residuo de arginina,
X₁₀₁ es un residuo de fenilalanina o ningún residuo,
X₁₀₂ es un residuo de glicina o un residuo de aspartato,
X₁₀₃ es un residuo de histidina o un residuo de prolina,

H4	--- D S G Y S S S W H F D Y - (SEQ ID NO:64)
H1	--- D R D Y G V N Y D A F D I (SEQ ID NO:16)
H2	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V (SEQ ID NO:32)
H12	- S R N W N Y D S Y Q Y G L D V (SEQ ID NO:192)
H9	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V (SEQ ID NO:144)
H3	G S S S W Y Y - Y N G M D V - (SEQ ID NO:48)

H7	- E R Q W L Y - - H Y G M D V (SEQ ID NO:112)
CONSENSO: (SEQ ID NO: 189)	X ₁₀₄ X ₁₀₅ X ₁₀₆ X ₁₀₇ X ₁₀₈ X ₁₀₉ YX ₁₁₀ X ₁₁₁ X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈

X₁₀₄ es un residuo de glicina o ningún residuo,
X₁₀₅ es un residuo de serina, un residuo de glutamato o ningún residuo,
X₁₀₆ es un residuo de arginina, un residuo de serina o ningún residuo,
X₁₀₇ es un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de serina o un residuo de glutamina,
X₁₀₈ es un residuo de serina, un residuo de arginina o un residuo de triptófano,
X₁₀₉ es un residuo de glicina, un residuo de aspartato, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina o un residuo de leucina,
X₁₁₀ es un residuo de serina, un residuo de glicina, un residuo de aspartato o ningún residuo,
X₁₁₁ es un residuo de serina, un residuo de valina, un residuo de asparagina o un residuo de tirosina,
X₁₁₂ es un residuo de serina, un residuo de asparagina, un residuo de tirosina o un residuo de histidina,
X₁₁₃ es un residuo de triptófano, un residuo de tirosina o un residuo de glutamina,
X₁₁₄ es un residuo de histidina, un residuo de aspartato, un residuo de tirosina o ningún residuo,
X₁₁₅ es un residuo de fenilalanina, un residuo de alanina o un residuo de glicina,
X₁₁₆ es un residuo de aspartato, un residuo de fenilalanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina,
X₁₁₇ es un residuo de tirosina o un residuo de aspartato,
X₁₁₈ es un residuo de isoleucina, un residuo de valina o ningún residuo

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

5

Tabla 1

Cadena ligera			
Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
A1	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO:11)	QDSKRPS (SEQ ID NO:12)	QAWDSSTAV (SEQ ID NO:13)
A2	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO:27)	AASSLQS (SEQ ID NO:28)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO:29)
A3	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:43)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	RQQNTYPLT (SEQ ID NO:45)
A4	RSSQSLLHSTGYNLYD (SEQ ID NO:59)	LGSFRAS (SEQ ID NO:60)	MQALQTPCS (SEQ ID NO:61)
A5	KSSQSILYSSNNKKYLV (SEQ ID NO:75)	WTSMRES (SEQ ID NO:76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO:77)
A6	RASQSISNYLN (SEQ ID NO:91)	ATSSLQS (SEQ ID NO:44)	QQSYSISPT (SEQ ID NO:93)
A7	RAGQGIRNDLV (SEQ ID NO:107)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNTYPFT (SEQ ID NO:109)
A8	KSSQSILYSSNNKKYLV (SEQ ID NO:175)	WTSMRES (SEQ ID NO:76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO:125)

A9	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO:27)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO:141)
A10	SGEKWGEKYAC (SEQ ID NO:155)	QDTRPS (SEQ ID NO:156)	QAWDRSTV (SEQ ID NO:157)
A11	SGDKLGDKFAF (SEQ ID NO:171)	QDNKRPS (SEQ ID NO:172)	QAWDSSTV (SEQ ID NO:173)
A12	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:35)	AASSLQS (SEQ ID NO:44)	LQHNSYTW (SEQ ID NO:189)
A13	SGDKLGDKYVC (SEQ ID NO:203)	LDNRPS (SEQ ID NO:204)	QAWDSSTV (SEQ ID NO:205)
A14	SGDKLGDKYAF (SEQ ID NO:219)	HDKRPS (SEQ ID NO:220)	QAWDSSTV (SEQ ID NO:205)

Tabla 2

Cadena pesada			
Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
A1	GYTFTSYGLS (SEQ ID NO:14)	WIIPYNGNTNSAQKLQ G (SEQ ID NO:15)	DRDYG VNYDAFDI (SEQ ID NO:16)
A2	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:30)	VIWYDGSNKYHADSV KG (SEQ ID NO:31)	SRNWN YDNYYYGL DV (SEQ ID NO:32)
A3	GFTFSSYWMS (SEQ ID NO:46)	NIKQDGSEYYVDSVK G (SEQ ID NO:47)	GSSSWY YNYGMD V (SEQ ID NO:48)
A4	GYTFTGYI (SEQ ID NO:62)	WINPNSGGTNYAQKF QG (SEQ ID NO:63)	DSGYSSSWHFDY (SEQ ID NO:64)
A5	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:78)	YIYSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:79)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO:80)
A6	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:94)	EINHSGGTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:95)	VQWLELAYFDY (SEQ ID NO:96)
A7	GFTFISYGMH (SEQ ID NO:110)	VIWYDGSTEYADSV KG (SEQ ID NO:111)	ERQWLYHYGMDV (SEQ ID NO:112)
A8	GGSFNSFYWS (SEQ ID NO:126)	YIYSGSTNYPNPSLKR (SEQ ID NO:127)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO:80)
A9	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:130)	VIWYDGSNKYHADSV KG (SEQ ID NO:31)	SRNWN YDNYYYGL DV (SEQ ID NO:144)
A10	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO:158)	IIPGSDSTRYSPSFQG (SEQ ID NO:159)	QGLGFDY (SEQ ID NO:160)

A11	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO:174)	YISYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:175)	AYGDYRGWFDP (SEQ ID NO:176)
A12	GFTFSAYGMH (SEQ ID NO:190)	VIWYDGSNKYYADSV KG (SEQ ID NO:191)	SRNWNYSYQYGL DV (SEQ ID NO:192)
A13	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO:206)	WISAYNGNTNYAQKF QG (SEQ ID NO:207)	DQDYDSSGWGH (SEQ ID NO:208)
A14	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO:222)	WISPYNGNTNYAQKF QG (SEQ ID NO:223)	DQDYDSSGWDP (SEQ ID NO:224)

Las secuencias nucleotídicas de A1-A14, o las secuencias aminoacídicas de A1-A14, pueden alterarse, por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio (p.ej., mutagénesis dirigida a oligonucleótido específica de sitio) para crear un polinucleótido alterado que comprende una o más sustituciones, deleciones o inserciones nucleotídicas particulares en comparación con el polinucleótido no mutado. Se describen ejemplos de técnicas para hacer dichas alteraciones en Walder *et al.*, 1986, *Gene* 42: 133; Bauer *et al.* 1985, *Gene* 37: 73; Craik, *BioTechniques*, enero de 1985, 12-19; Smith *et al.*, 1981, "Genetic Engineering: Principles and Methods", Plenum Press y las patentes de EE.UU. n° 4.518.584 y 4.737.462. Estos y otros métodos pueden usarse para elaborar, por ejemplo, derivados de anticuerpos anti-activina A que tengan una propiedad deseada, por ejemplo afinidad, avidez o especificidad por activina A aumentadas, actividad o estabilidad *in vivo* o *in vitro* aumentadas o efectos secundarios *in vivo* reducidos en comparación con el anticuerpo no derivatizado.

Otros derivados de anticuerpos anti-activina A pueden incluir conjugados covalentes o agregativos de anticuerpos anti-activina A, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados con el extremo N o el extremo C de un polipéptido anticuerpo anti-activina A. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal heterólogo (o líder), p.ej. el líder factor alfa de levadura, o un péptido tal como un marcador epitópico. Las proteínas de fusión que contienen proteína de unión a antígeno pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de una proteína de unión a antígeno (p.ej., poli-His). Una proteína de unión a antígeno puede estar también ligada con el péptido FLAG Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:226) como se describe en Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1204, 1988 y la patente de EE.UU. 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente a un anticuerpo monoclonal (AcM), posibilitando un ensayo rápido y una purificación sencilla de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en que se fusiona el péptido FLAG con un polipéptido dado están comercialmente disponibles (Sigma, St. Louis, MO).

Puede crearse un dímero que comprende dos proteínas de fusión fusionando un fragmento de unión a activina A de un anticuerpo anti-activina A con la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede elaborarse, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble como las moléculas de tipo anticuerpo, tras de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos Fc, procurando el dímero.

El término "polipéptido de Fc", como se usa en la presente memoria, incluye formas nativas y de muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Se incluyen también formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región de bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de ellos) ofrecen la ventaja de una purificación sencilla por cromatografía de afinidad frente a columnas de proteína A o proteína G.

Es un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región de bisagra N-terminal al extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humano. Es otro polipéptido de Fc útil la muteína de Fc descrita en la patente de EE.UU. n° 5.457.035 y en Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13: 3992-4001. La secuencia aminoacídica de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto porque el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe una afinidad reducida por los receptores de Fc.

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

La presente invención proporciona anticuerpos que interfieren con la unión de activina A a un receptor de activina A.

En dichos anticuerpos puede cribarse en ensayos convencionales la capacidad de interferir con la unión de activina A al receptor de activina A. Son ejemplos de ensayos adecuados ensayos que prueban la capacidad de las proteínas de unión a antígeno de inhibir la unión de activina A a células que expresan el receptor de activina A, o que prueban la capacidad de las proteínas de unión a antígeno de reducir la respuesta biológica o celular resultante de la unión de activina A a receptores de activina A de superficie celular. Por ejemplo, como se enuncia en la Figura 10, así como en los Ejemplos siguientes, los anticuerpos pueden cribarse según su capacidad de unirse a superficies de anticuerpo inmovilizado (activina A y/o activina B).

Los fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden producirse mediante técnicas convencionales. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab y F(ab')₂. Se contemplan también fragmentos de anticuerpo producidos por técnicas de ingeniería genética.

Realizaciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, p.ej. versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos (p.ej. de murino). Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando se administran los anticuerpos a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende el dominio variable de un anticuerpo de murino (o todo o parte del sitio de unión a antígeno del mismo) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de murino y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y genomanipulados adicionalmente incluyen aquellos descritos en Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323, Liu *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 3439, Larrick *et al.*, 1989, *Bio/Technology* 7: 934 y Winter *et al.*, 1993, *TIPS* 14: 139. En una realización, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo injertado con CDR. Se discuten técnicas para humanizar anticuerpos, p.ej., en las patentes de EE.UU. n° 5.869.619, 5.225.539, 5.821.337, 5.859.205, 6.881.557, Padlan *et al.*, 1995, *FASEB J.* 9: 133-39 y Tamura *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164: 1432-41.

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

Es un ejemplo de un inmunógeno adecuado una activina A humana soluble, tal como un polipéptido que comprende el dominio extracelular de la proteína de SEQ ID NO:225, u otros fragmentos inmunogénicos de la proteína de SEQ ID NO:225. Se describen ejemplos de técnicas para la producción y uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos o parcialmente humanos en las patentes de EE.UU. n° 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806, Davis *et al.*, 2003, "Production of human antibodies from transgenic mice in Lo", ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ: 191-200, Kellermann *et al.*, 2002, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-97, Russel *et al.*, 2000, *Infect. Immun.* 68: 1820-26, Gallo *et al.*, 2000, *Eur. J. Immun.* 30: 534-40, Davis *et al.*, 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18: 421-25, Green, 1999, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23, Jakobovits, 1998, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 33-42, Green *et al.*, 1998, *J. Exp. Med.* 188: 483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7: 607-14, Tsuda *et al.*, 1997, *Genomics* 42: 413-21, Mendez *et al.*, 1997, *Nat. Genet.* 15: 146-56, Jakobovits, 1994, *Curr. Biol.* 4: 761-63, Arbones *et al.*, 1994, *Immunity* 1: 247-60, Green *et al.*, 1994, *Nat. Genet.* 7: 13-21, Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362: 255-58, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-55. Chen, J., M. Trounstine, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar, *Inter'l Immunol.* 5 (1993): 647-656, Choi *et al.*, 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14: 845-51, Harding *et al.*, 1995, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg *et al.*, 1995, *Internal Review of Immunology* 13: 65-93, Neuberger, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 826, Taylor *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-95, Taylor *et al.*, 1994, *Inter'l Immunol.* 6: 579-91, Tomizuka *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 16: 133-43, Tomizuka *et al.*, 2000, *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 97: 722-27, Tuailon *et al.*, 1993, *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 90: 3720-24 y Tuailon *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152: 2912-20.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a activina A. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la materia, p.ej. inmortalizando células de bazo recogidas del animal transgénico después de la terminación del programa de inmunización. Las células de bazo pueden inmortalizarse usando cualquier técnica conocida en la materia, p.ej. fusionándolas con células de mieloma produciendo hibridomas. Las células de mieloma para uso en procedimientos de fusión productores de hibridoma son preferiblemente no productoras de anticuerpos, tienen una alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las vuelven incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que apoyan el crecimiento solo de las células fusionadas (hibridomas). Los ejemplos de estirpes celulares adecuadas para uso en fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14 FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; los ejemplos de estirpes celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras estirpes celulares útiles para fusiones celulares son U-266,

GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En una realización, se produce una estirpe celular de hibridoma inmunizando un animal (p.ej., un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno de activina A; recolectando células de bazo del animal inmunizado; fusionando las células de bazo recolectadas con una estirpe celular de mieloma, generando así células de hibridoma; estableciendo estirpes celulares de hibridoma a partir de las células de hibridoma e identificando una estirpe celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido de activina A. Dichas estirpes celulares de hibridoma, y los anticuerpos monoclonales anti-activina A producidos por ellas, están englobados por la presente invención.

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

Se ha usado también la evolución molecular de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en el centro del sitio de unión de anticuerpo para aislar anticuerpos con afinidad aumentada, por ejemplo anticuerpos que tengan una afinidad aumentada por c-erbB-2, como se describe en Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263: 551. Por consiguiente, dichas técnicas son útiles para preparar anticuerpos de activina A.

Las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra activina A pueden usarse, por ejemplo, en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos de activina A *in vitro* o *in vivo*. Las proteínas de unión a antígeno pueden emplearse también para purificar proteínas de activina A por cromatografía de inmunoafinidad. Aquellas proteínas de unión a antígeno que pueden bloquear adicionalmente la unión de activina A pueden usarse para inhibir una actividad biológica resultante de dicha unión. El bloqueo de proteínas de unión a antígeno puede usarse en los métodos de la presente invención. Dichas proteínas de unión a antígeno, que funcionan como antagonistas de activina A, pueden emplearse en el tratamiento de cualquier afección relacionada con activina A, incluyendo pero sin limitación la caquexia. En una realización, se emplea en el tratamiento de dichas afecciones un anticuerpo monoclonal anti-activina A humana generado mediante procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos.

Aunque los anticuerpos humanos, parcialmente humanos o humanizados serán adecuados para muchas aplicaciones, particularmente aquellas que implican la administración del anticuerpo a un sujeto humano, serán adecuados otros tipos de proteínas de unión a antígeno para ciertas aplicaciones. Los anticuerpos no humanos de la invención pueden derivar, por ejemplo, de cualquier animal productor de anticuerpos tal como ratón, rata, conejo, cabra, asno o primate no humano (tal como mono (p.ej. macaco cangrejero o mono Rhesus) o simio (p.ej. chimpancé)). Los anticuerpos no humanos de la invención pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones *in vitro* y basadas en cultivo celular o cualquier otra aplicación en que no aparezca, sea insignificante, pueda prevenirse, no sea un problema o se desee una respuesta inmunitaria ante el anticuerpo de la invención. En una realización, se administra un anticuerpo no humano de la invención a un sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano no desencadena una respuesta inmunitaria en el sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano es de la misma especie que el sujeto no humano, p.ej. un anticuerpo de ratón de la invención se administra a un ratón. Puede elaborarse un anticuerpo de una especie particular, por ejemplo, inmunizando un animal de esa especie con el inmunógeno deseado (p.ej., polipéptido de activina A soluble) o usando un sistema artificial para generar anticuerpos de esa especie (p.ej., un sistema basado en la exhibición bacteriana o en fago para generar anticuerpos de una especie particular), o convirtiendo un anticuerpo de una especie en un anticuerpo de otra especie reemplazando, p.ej., la región constante del anticuerpo por una región constante de la otra especie, o reemplazando uno o más residuos aminoácidos del anticuerpo de modo que se parezca más estrechamente a la secuencia de un anticuerpo de la otra especie. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende secuencias aminoácidas derivadas de anticuerpos de dos o más especies diferentes.

Pueden prepararse proteínas de unión a antígeno mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden purificarse a partir de células que las expresan naturalmente (p.ej., un anticuerpo puede purificarse a partir de un hibridoma que lo produce), o producirse en sistemas de expresión recombinante, usando cualquier técnica conocida en la materia. Véanse, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses", Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980) y "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Puede usarse cualquier sistema de expresión conocido en la materia para elaborar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, se transforman células hospedadoras con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido deseado. Entre las células hospedadoras que pueden emplearse, están células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores. Las procarióticas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o *Bacilli*. Las células eucarióticas superiores incluyen células de insecto y estirpes celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de estirpes celulares de mamífero adecuadas incluyen la estirpe celular COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23: 175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, estirpes celulares BHK (ATCC CRL 10) y la estirpe celular CVI/EBNA derivada de la estirpe celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como se describe en McMahan *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 2821. Se describen

vectores de clonación y expresión apropiados para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamífero en Pouwels *et al.* ("Cloning Vectors: A Laboratory Manual", Elsevier, Nueva York, 1985).

Las células transformadas pueden cultivarse en condiciones que promuevan la expresión del polipéptido, y recuperarse el polipéptido mediante procedimientos de purificación de proteína convencionales. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, p.ej., sobre una matriz que tiene toda o una porción (p.ej. el dominio extracelular) de activina A unida a la misma. Los polipéptidos contemplados para uso en la presente memoria incluyen polipéptidos de anticuerpo anti-activina A de mamífero recombinantes sustancialmente homogéneos sustancialmente libres de materiales endógenos contaminantes.

Las proteínas de unión a antígeno pueden prepararse, y cribarse las propiedades deseadas, mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas. Ciertas de las técnicas implican aislar un ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica (o porción de la misma) de una proteína de unión a antígeno de interés (p.ej., un anticuerpo anti-activina A) y manipular el ácido nucleico mediante tecnología de ADN recombinante. El ácido nucleico puede fusionarse con otro ácido nucleico de interés o alterarse (p.ej., mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, eliminar o sustituir uno o más residuos aminoácidos, por ejemplo.

En un aspecto, la presente invención proporciona fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo anti-activina A de la invención. Dichos fragmentos pueden consistir únicamente en secuencias derivadas de anticuerpo o pueden comprender secuencias adicionales. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos de dominio. Se proporcionan otros ejemplos en Lunde *et al.*, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30: 500-06.

Pueden formarse anticuerpos monocatenarios ligando fragmentos de dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) a través de un puente aminoácido (ligador peptídico corto), dando como resultado una sola cadena polipeptídica. Dichos Fv monocatenarios (scFv) se han preparado fusionando ADN que codifica un ligador peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes pueden replegarse en sí mismos formando monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (p.ej., dímeros, trímeros o tetrámeros), dependiendo de la longitud del ligador flexible entre los dos dominios variables (Kortt *et al.*, 1997, Prot. Eng. 10: 423; Kortt *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18: 95-108). Al combinar diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H, pueden formarse scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18: 31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos monocatenarios incluyen aquellas descritas en la patente de EE.UU. n° 4.946.778; Bird, 1988, Science 242: 423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879; Ward *et al.*, 1989, Nature 334: 544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol. Biol. 178: 379-87. Los anticuerpos monocatenarios derivados de anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, scFv que comprenden las combinaciones de dominios variables L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13 y L14H14, que están englobados por la presente invención.

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

Son conocidas técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente a partir de un anticuerpo de interés, concretamente cambio de clase. Por tanto, los anticuerpos de IgG pueden derivar de un anticuerpo de IgM, por ejemplo, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo original), pero exhiben también propiedades biológicas asociadas a un isotipo o subclase de anticuerpo diferente del anticuerpo original. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. Puede emplearse ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares en dichos procedimientos, p.ej. ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase también Lantto *et al.*, 2002, Methods Mol. Biol. 178: 303-16.

En una realización, una proteína de unión a antígeno de la invención comprende tanto el dominio de cadena pesada de IgG1, o un fragmento del mismo, de A1 (L1) como el dominio de cadena ligera kappa, o un fragmento del mismo, de A1 (L1).

Si se desea una IgG4, puede desearse también introducir una mutación puntual (CPSCP -> CPPCP) en la región de bisagra como se describe en Bloom *et al.*, 1997, Protein Science 6: 407) para aliviar la tendencia a formar puentes disulfuro entre cadenas H que pueden conducir a heterogeneidad en los anticuerpos de IgG4.

En una realización, la proteína de unión a antígeno tiene una K_{off} de 1x10⁻⁴ s⁻¹ o menor. En otra realización, la K_{off} es de 5x10⁻⁵ s⁻¹ o menor.

Como se usa en la presente memoria, el término activina A humana pretende incluir la proteína de SEQ ID NO:1 y

variantes alélicas de la misma. La activina A puede purificarse a partir de células hospedadoras que se han transfectado por un gen que codifica activina A mediante la elución del sobrenadante filtrado del cultivo de célula hospedadora usando una columna de Heparin HP, usando un gradiente salino.

El término "anticuerpo" hace referencia a un anticuerpo intacto o a un fragmento de unión del mismo. Un anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo completa (incluyendo las versiones policlonal, monoclonal, quimérica, humanizada o humana que tienen cadenas pesadas y/o ligeras completas), o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos $F(ab')_2$, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y pueden incorporarse a anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos monocatenarios, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, p.ej., Hollinger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.*, 23, 9, 1126-1136). Se dan a conocer también polipéptidos de anticuerpo en la patente de EE.UU. nº 6.703.199, incluyendo monocuerpos polipeptídicos de fibronectina. Se dan a conocer otros polipéptidos de anticuerpo en la publicación de patente de EE.UU. 2005/0238646 que son polipéptidos monocatenarios.

Los fragmentos de unión a antígeno derivados de un anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros según métodos convencionales. A modo de ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina, proporcionando un fragmento de 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse además usando un agente reductor de tiol, produciendo fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Opcionalmente, puede efectuarse la reacción de escisión usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrido, que es el resultado de la escisión de ligamientos disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando papaína produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patente de EE.UU. nº 4.331.647, Nisonoff *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959; Edelman *et al.*, en *Methods in Enzymology* 1: 422 (Academic Press 1967) y en Andrews, S.M. y Titus, J.A. en "Current Protocols in Immunology" (Coligan J.E., *et al.*, eds), John Wiley & Sons, Nueva York (2003), páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10A.1-2.10A.5. Pueden usarse también otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separar las cadenas pesadas formando fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada (Fd), escindir adicionalmente los fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, a condición de que los fragmentos se unan al antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto.

Un fragmento de anticuerpo puede ser también cualquier proteína sintética o genomanipulada. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de cadena ligera, fragmentos "Fv" consistentes en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un ligador peptídico (proteínas scFv).

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

Por ejemplo, el dominio de la región V puede ser monomérico y ser un dominio V_H o V_L , que es capaz de unirse independientemente a activina A humana con una afinidad al menos igual a $1 \times 10^{-7} M$ o menos como se describe a continuación. Como alternativa, el dominio de la región V puede ser dímérico y contener dímeros V_H-V_H , V_H-V_L o V_L-V_L . El dímero de la región V comprende al menos una cadena V_H y al menos una V_L , que pueden estar asociadas no covalentemente (al que se hace referencia de aquí en adelante como Fv). Si se desea, las cadenas pueden acoplarse covalentemente directamente, por ejemplo a través de un enlace disulfuro entre los dos dominios variables, o mediante un ligador, por ejemplo un ligador peptídico, formando un Fv monocatenario (scFv).

El dominio de la región variable puede ser cualquier dominio variable de origen natural o una versión genomanipulada del mismo. Se entiende por versión genomanipulada un dominio de región variable que se ha creado usando técnicas de genomanipulación de ADN recombinante. Dichas versiones genomanipuladas incluyen aquellas creadas, por ejemplo, a partir de una región variable de anticuerpo específica mediante inserciones, deleciones o cambios en las secuencias aminoácidas del anticuerpo específico. Los ejemplos particulares incluyen dominios de región variable genomanipulados que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos estructurales de un primer anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo.

El dominio de región variable puede enlazarse covalentemente en el aminoácido C-terminal con al menos otro dominio de anticuerpo o fragmento del mismo. Por tanto, por ejemplo, un dominio V_H que está presente en el dominio de región variable puede ligarse con un dominio CH1 de inmunoglobulina, o un fragmento del mismo. De

forma similar, un dominio V_L puede ligarse con un dominio C_K o un fragmento del mismo. De este modo, por ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión a antígeno contiene dominios V_H y V_L asociados ligados covalentemente en sus extremos C con un dominio CH1 y C_K , respectivamente. El dominio CH1 puede extenderse con aminoácidos adicionales, por ejemplo proporcionando una región de bisagra o una porción de un dominio de región de bisagra como se encuentra en un fragmento Fab', o proporcionando dominios adicionales tales como dominios CH2 y CH3 de anticuerpo.

Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos comprenden al menos una de estas CDR. Por ejemplo, pueden incorporarse una o más CDR a regiones estructurales de anticuerpo conocidas (IgG1, IgG2, etc.),

En ciertas realizaciones preferidas, un anticuerpo comprende uno o más enlazamientos poliméricos hidrosolubles incluyendo, pero sin limitación, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol. Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. En ciertas realizaciones, un agente de unión a derivado comprende uno o más de monometoxipolietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidrato, poli-(*N*-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p.ej. glicerol) y polivinilalcohol, así como mezclas de dichos polímeros. En ciertas realizaciones, se enlazan aleatoriamente uno o más polímeros hidrosolubles con una o más cadenas laterales. En ciertas realizaciones, el PEG puede actuar mejorando la capacidad terapéutica para un agente de unión, tal como un anticuerpo. Se discuten algunos de dichos métodos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.133.426,

Se apreciará que un anticuerpo de la presente invención puede tener al menos una sustitución aminoacídica, a condición de que el anticuerpo retenga la especificidad de unión. Por lo tanto, las modificaciones de las estructuras de anticuerpo están englobadas dentro del alcance de la invención. Estas pueden incluir sustituciones aminoacídicas, que pueden ser conservativas o no conservativas, que no destruyan la capacidad de unión a activina A de un anticuerpo. Las sustituciones aminoacídicas conservativas pueden englobar residuos aminoacídicos de origen no natural, que se incorporan típicamente por síntesis peptídica química en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de restos aminoacídicos. Una sustitución aminoacídica conservativa puede implicar también una sustitución de un residuo aminoacídico nativo por un residuo normativo, de tal modo que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo aminoacídico en esa posición.

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

Además, un especialista en la materia puede generar variantes de prueba que contienen una sola sustitución aminoacídica en cada residuo aminoacídico deseado. Pueden cribarse entonces las variantes usando ensayos de actividad conocidos por los especialistas en la materia. Dichas variantes podrían usarse para reunir información sobre las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio a un residuo aminoacídico particular daba como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, pueden evitarse las variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información reunida a partir de dichos experimentos rutinarios, un especialista en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos en que deberían evitarse sustituciones adicionales solas o en combinación con otras mutaciones.

Un especialista en la materia será capaz de determinar las variantes adecuadas del polipéptido como se enuncia en la presente memoria usando técnicas bien conocidas. En ciertas realizaciones, un especialista en la materia puede identificar las zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad al orientarse a regiones que se cree que no son importantes para la actividad. En ciertas realizaciones, pueden identificarse residuos y porciones de las moléculas que están conservados entre polipéptidos similares. En ciertas realizaciones, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones aminoacídicas conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura polipeptídica.

Adicionalmente, un especialista en la materia puede revisar los estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de dicha comparación, puede predecirse la importancia de los residuos aminoacídicos en una proteína que se corresponden a los residuos aminoacídicos que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un especialista en la materia puede optar por sustituciones aminoacídicas químicamente similares para dichos residuos aminoacídicos predichos importantes.

Un especialista en la materia puede analizar también la estructura tridimensional y secuencia aminoacídica en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un especialista en la materia puede predecir el alineamiento de residuos aminoacídicos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En ciertas realizaciones, un especialista en la materia puede elegir no hacer cambios radicales en los residuos aminoacídicos que se predice que están sobre la superficie de la proteína, puesto que dichos residuos

pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas.

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

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

En ciertas realizaciones, las variantes de los anticuerpos incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o el tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias aminoacídicas del polipéptido original. En ciertas realizaciones, las variantes comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación *N*-ligados que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación *N*-ligado se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo aminoacídico designado como X puede ser cualquier residuo aminoacídico excepto prolina. La sustitución de los residuos aminoacídicos para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato *N*-ligada. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia retirarán una cadena de carbohidrato *N*-ligada existente. Se proporciona también una redistribución de las cadenas de carbohidrato *N*-ligadas en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación *N*-ligados (típicamente aquellos que son de origen natural) y se crean uno o más sitios *N*-ligados nuevos. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se eliminan uno o más residuos de cisteína o se sustituyen por otro aminoácido (p.ej., serina) en comparación con la secuencia aminoacídica original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben replegarse en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y tienen típicamente un número par para minimizar las interacciones resultantes de cisteínas desapareadas.

Las sustituciones aminoacídicas deseadas (tanto conservativas como no conservativas) pueden determinarse por los especialistas en la materia en el momento en que se deseen dichas sustituciones. En ciertas realizaciones, pueden usarse sustituciones aminoacídicas para identificar residuos importantes de anticuerpos de activina A, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos de activina A descritos en la presente memoria.

Según ciertas realizaciones, son sustituciones aminoacídicas preferidas aquellas que: (1) reducen la sensibilidad a la proteólisis, (2) reducen la sensibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para la formación de complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en dichos polipéptidos. Según ciertas realizaciones, pueden hacerse sustituciones aminoacídicas sencillas o múltiples (en ciertas realizaciones, sustituciones aminoacídicas conservativas) en la secuencia de origen natural (en ciertas realizaciones, en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman los contactos intermoleculares). En ciertas realizaciones, una sustitución aminoacídica conservativa típicamente puede no cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (p.ej., un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper la hélice que aparece en la secuencia original, o desestabilizar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la materia en "Proteins, Structures and Molecular Principles" (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); "Introduction to Protein Structure" (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)) y Thornton *et al.* *Nature* 354: 105 (1991).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden unirse químicamente con polímeros, lípidos u otros restos.

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

Una vez sintetizado, el ADN que codifica un anticuerpo de la invención o fragmento del mismo puede propagarse y

expresarse según cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos para la escisión, ligamiento, transformación y transfección de ácidos nucleicos usando cualquier número de vectores de expresión conocidos. Por tanto, en ciertas realizaciones, puede preferirse la expresión de un fragmento de anticuerpo en un hospedador procariótico tal como *Escherichia coli* (véase, p.ej., Pluckthun *et al.*, 1989 *Methods Enzymol.* 178: 497-515). En ciertas otras realizaciones, puede preferirse la expresión del anticuerpo o un fragmento del mismo en una célula hospedadora eucariótica, incluyendo levadura (p.ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), células animales (incluyendo células de mamífero) y células vegetales. Los ejemplos de células animales adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de mieloma (tal como una estirpe NSO de ratón), COS, CHO o de hibridoma. Los ejemplos de células vegetales incluyen células de tabaco, maíz, soja y arroz.

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

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

Pueden obtenerse otros anticuerpos según la invención mediante procedimientos de inmunización y fusión celular convencionales como se describen en la presente memoria y son conocidos en la materia. Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden generarse usando una variedad de técnicas conocidas. En general, los anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos específicos pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495, 1975; Coligan *et al.* (eds.), "Current Protocols in Immunology", 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); patentes de EE.UU. nº RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993; "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses", Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.) (1980); y "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Picklesley *et al.*, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," en "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª edición, Glover *et al.* (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)). Los fragmentos de anticuerpo pueden derivar de los mismos usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica, u opcionalmente, mediante digestión proteolítica (por ejemplo usando papaína o pepsina) seguida de reducción suave de los puentes disulfuro y alquilación. Como alternativa, dichos fragmentos pueden generarse también mediante técnicas de ingeniería genética recombinante como se describen en la presente memoria.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando a un animal, por ejemplo una rata, hámster, conejo o preferiblemente ratón, incluyendo por ejemplo uno transgénico o con desactivación génica, como son conocidos en la materia, un inmunógeno que comprende activina A humana de SEQ ID NO:66 o un fragmento de la misma, según métodos conocidos en la materia y descritos en la presente memoria. La presencia de producción de anticuerpo específico puede monitorizarse después de la inyección inicial y/o después de una inyección de recuerdo obteniendo una muestra de suero y detectando la presencia de un anticuerpo que se une a activina A humana o péptido usando uno cualquiera de los varios métodos de inmunodetección conocidos en la materia y descritos en la presente memoria. A partir de animales productores de los anticuerpos deseados, se retiran células linfoides, lo más comúnmente células de bazo o nódulo linfático, obteniendo linfocitos B. Los linfocitos B se fusionan entonces con un copartícipe de fusión celular de mieloma sensibilizado con fármaco, preferiblemente uno que sea singénico del animal inmunizado, y que tenga opcionalmente otras propiedades deseables (p.ej. incapacidad de expresar productos génicos de Ig endógenos, p.ej. P3X63 - Ag 8.653 (ATCC nº CRL 1580); NSO, SP20), produciendo hibridomas, que son estirpes celulares eucarióticas inmortales.

Las células linfoides (p.ej. de bazo) y las células de mieloma pueden combinarse durante unos pocos minutos con un agente promotor de la fusión de membrana, tal como polietilenglicol o un detergente no iónico, y sembrarse entonces a baja densidad en un medio selectivo que apoye el crecimiento de células de hibridoma pero no de células de mieloma no fusionadas. Es un medio de selección preferido HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente aproximadamente de una a dos semanas, se observan colonias de células. Se aíslan colonias individuales y puede ensayarse en los anticuerpos producidos por las células la actividad de unión a activina A humana, usando uno cualquiera de una variedad de inmunoensayos conocidos en la materia y descritos en la presente memoria. Se clonan los hibridomas (p.ej., mediante clonación de dilución limitante o aislamiento en placa de agar blando) y se seleccionan y cultivan los clones positivos que producen un anticuerpo específico de activina A. Los anticuerpos monoclonales de los cultivos de hibridoma pueden aislarse de los sobrenadantes de cultivos de hibridoma.

Es un método alternativo para la producción de un anticuerpo monoclonal de murino inyectar las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón singénico, por ejemplo un ratón que se ha tratado (p.ej., cebado con pristano) para promover la formación de fluido ascítico que contiene el anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía por afinidad con Protein-A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véanse, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" en "Methods in Molecular Biology", Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)). Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía de afinidad usando un ligando apropiado seleccionado basándose en las propiedades particulares del anticuerpo (p.ej., isotipo de cadena pesada o ligera, especificidad de unión, etc.). Los ejemplos de ligando adecuado, inmovilizado sobre un soporte sólido, incluyen proteína A, proteína G, anticuerpo anti-región constante (de cadena ligera o cadena pesada), anticuerpo antiidiotípico y proteína de unión a TGF-beta, o un fragmento o variante de los mismos.

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

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos pueden generarse mediante cualquier serie de técnicas con las que están familiarizados los especialistas en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, transformación con virus de Epstein-Barr (EBV) de células de sangre periférica humanas (p.ej., que contienen linfocitos B), inmunización *in vitro* de linfocitos B humanos, fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados portadores de genes de inmunoglobulina humana insertados, aislamiento de colecciones en fago de la región V de inmunoglobulina humana u otros procedimientos conocidos en la materia y basados en la divulgación de la presente memoria. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales totalmente humanos a partir de ratones transgénicos que se han genomanipulado para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica. Se describen métodos para obtener anticuerpos totalmente humanos a partir de ratones transgénicos, por ejemplo, en Green *et al.*, *Nature Genet.* 7: 13, 1994; Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856, 1994; Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6: 579, 1994; patente de EE.UU. nº 5.877.397; Bruggemann *et al.*, 1997 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 455-58; Jakobovits *et al.*, 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 525-35. En esta técnica, se introducen elementos del locus de cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de estirpes de citoblastos embrionarios que contienen desestabilizaciones orientadas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógenos (véase también Bruggemann *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 455-58 (1997)). Por ejemplo, los transgenes de inmunoglobulina humana pueden ser constructos minigénicos, o transloci en cromosomas artificiales de levadura, que experimentan redistribución de ADN específico de linfocitos B e hipermutación en el tejido linfóide de ratón. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales totalmente humanos inmunizando los ratones transgénicos, que pueden producir entonces anticuerpos humanos específicos de activina A. Las células linfoides de los ratones transgénicos inmunizados pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpo humano según los métodos descritos en la presente memoria. Pueden obtenerse también sueros policlonales que contienen anticuerpos totalmente humanos a partir de la sangre de los animales inmunizados.

Otro método para generar anticuerpos humanos de la invención incluye immortalizar células de sangre periférica humana por transformación de EBV. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº 4.464.456. Dicha estirpe celular de

linfocitos B (o estirpe celular linfoblastoide) inmortalizada productora de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a activina A puede identificarse mediante métodos de inmunodetección como se proporcionan en la presente memoria, por ejemplo un ELISA, y aislarse entonces mediante técnicas de clonación estándares. La estabilidad de la estirpe celular linfoblastoide productora de anticuerpo anti-activina A puede mejorarse fusionando la estirpe celular transformada con una mieloma de múrido, produciendo una estirpe celular híbrida ratón-humano según métodos conocidos en la materia (véase, p.ej., Glasky *et al.*, Hybridoma 8: 377-89 (1989)). Es aún otro método de generar anticuerpos monoclonales humanos la inmunización *in vitro*, que incluye cebar linfocitos B esplénicos humanos con activina A humana, seguido de fusión de los linfocitos B cebados con un copartícipe de fusión heterohíbrido. Véase, p.ej., Boerner *et al.*, 1991 J. Immunol. 147: 86-95.

En ciertas realizaciones, se selecciona un linfocito B que produce un anticuerpo anti-activina A humana y se clonan las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del linfocito B según técnicas de biología molecular conocidas en la materia (documento WO 92/02551; patente de EE.UU. nº 5.627.052; Babcook *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48 (1996)) y descritas en la presente memoria. Los linfocitos B de un animal inmunizado pueden aislarse del bazo, nódulo linfático o muestra de sangre periférica seleccionando una célula productora de un anticuerpo que se une específicamente a activina A. Los linfocitos B pueden aislarse también de seres humanos, por ejemplo de una muestra de sangre periférica. Los métodos para detectar linfocitos B individuales productores de un anticuerpo con la especificidad deseada son bien conocidos en la materia, por ejemplo mediante formación de placa, clasificación celular activada por fluorescencia, estimulación *in vitro* seguida de detección del anticuerpo específico, y similares. Los métodos para selección de linfocitos B productores de anticuerpo específico incluyen, por ejemplo, preparar una suspensión monocelular de linfocitos B en agar blando que contiene activina A humana. La unión del anticuerpo específico producido por el linfocito B al antígeno da como resultado la formación de un complejo, que puede ser visible como un inmunoprecipitado. Después de seleccionar los linfocitos B productores del anticuerpo deseado, pueden clonarse los genes de anticuerpo específicos aislando y amplificando el ADN o ARNm según métodos conocidos en la materia y descritos en la presente memoria.

Es un método adicional para obtener anticuerpos de la invención mediante exhibición en fago. Véanse, p.ej., Winter *et al.*, 1994 Annu. Rev. Immunol. 12: 433-55; Burton *et al.*, 1994 Adv. Immunol. 57: 191-280. Pueden crearse colecciones combinatorias génicas de la región variable de inmunoglobulina humana o de múrido en vectores de fago, que pueden cribarse para seleccionar los fragmentos de Ig (Fab, Fv, sFv o multímeros de los mismos) que se unen específicamente a la proteína de unión a TGF-beta o variante o fragmento de la misma. Véanse, p.ej., la patente de EE.UU. nº 5.223.409; Huse *et al.*, 1989 Science 246: 1275-81; Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5728-32 (1989); Altling-Mees *et al.*, Strategies in Molecular Biology 3: 1-9 (1990); Kang *et al.*, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4363-66; Hoogenboom *et al.*, 1992 J. Molec. Biol. 227: 381-388; Schlebusch *et al.*, 1997 Hybridoma 16: 47-52 y las referencias citadas en los mismos. Por ejemplo, puede insertarse una colección que contiene una pluralidad de secuencias polinucleotídicas que codifican fragmentos de la región variable de Ig en el genoma de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o una variante del mismo, en fase con la secuencia que codifica una proteína de cubierta de fago. Una proteína de fusión puede ser una fusión de la proteína de cubierta con el dominio de región variable de cadena ligera y/o con el dominio de región variable de cadena pesada. Según ciertas realizaciones, los fragmentos Fab de inmunoglobulina pueden exhibirse también en una partícula de fago (véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº 5.698.426).

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

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

Una vez se han obtenido las células productoras de anticuerpo según la invención usando cualquiera de la inmunización y otras técnicas anteriormente descritas, pueden clonarse los genes de anticuerpo específico mediante aislamiento y amplificación de ADN o ARNm de los mismos según procedimientos estándares como se describen en la presente memoria. Los anticuerpos producidos a partir de los mismos pueden secuenciarse e identificarse las CDR y puede manipularse el ADN que codifica las CDR como se describe anteriormente, generando otros anticuerpos según la invención.

Se entenderá por un especialista en la materia que algunas proteínas, tales como los anticuerpos, pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones depende a menudo de la estirpe de célula hospedadora usada para expresar la proteína, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperizina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Es una modificación frecuente la pérdida del residuo básico carboxiterminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995).

Ácidos nucleicos

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas. Los ácidos nucleicos comprenden polinucleótidos que codifican una proteína de unión a antígeno, por ejemplo una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención.

Pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo secuencias reguladoras, y/o ser parte de un ácido nucleico mayor, por ejemplo un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN y variantes artificiales de los mismos (p.ej., ácidos peptidonucleicos).

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de anticuerpo (p.ej., cadena pesada o ligera, dominio variable solo o completo) pueden aislarse de linfocitos B de ratones que se han inmunizado con activina A. El ácido nucleico puede aislarse mediante procedimientos convencionales tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se muestran anteriormente las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera. El especialista en la materia apreciará que, debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias polipeptídicas dada a conocer en la presente memoria está codificada por un gran número de otras secuencias de ácido nucleico. La presente invención proporciona cada secuencia nucleotídica degenerada que codifica cada proteína de unión a antígeno de la invención.

Pueden introducirse cambios mediante mutación en un ácido nucleico, conduciendo así a cambios en la secuencia aminoacídica del polipéptido (p.ej., una proteína de unión a antígeno) que codifica. Pueden introducirse mutaciones usando cualquier técnica conocida en la materia. En una realización, se cambian uno o más residuos aminoacídicos particulares usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida a sitio. En otra realización, se cambian uno o más residuos seleccionados aleatoriamente usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis aleatoria. Independientemente de cómo se haga, puede expresarse un polipéptido mutante y cribarse una propiedad deseada (p.ej., unión a activina A).

Las mutaciones pueden introducirse en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica del polipéptido que codifica. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones nucleotídicas que conducen a sustituciones aminoacídicas en residuos aminoacídicos no esenciales. En una realización, se muta una secuencia nucleotídica proporcionada en la presente memoria para A1, o un fragmento, variante o derivado deseado de la misma, de tal modo que codifique una secuencia aminoacídica que comprende una o más delecciones o sustituciones de residuos aminoacídicos que se muestra en la presente memoria para A1 que son residuos en que difieren dos o más secuencias.

En otra realización, la mutagénesis inserta un aminoácido adyacente a uno o más residuos aminoacídicos que se muestra en la presente memoria para A1 que son residuos en que difieren dos o más secuencias. Como alternativa, pueden introducirse una o más mutaciones en un ácido nucleico que cambian selectivamente la actividad biológica (p.ej., unión de activina A) del polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica. Los ejemplos de cambios cuantitativos incluyen aumentar, reducir o eliminar la actividad. Los ejemplos de cambios cualitativos incluyen cambiar la especificidad antigénica de una proteína de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores víricos, vectores no episómicos de mamífero y vectores de expresión, por ejemplo vectores de expresión recombinantes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras para usar para expresión, que están ligadas operativamente con la secuencia de ácido nucleico para expresar. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de células hospedadoras (p.ej., potenciador del gen temprano de SV40, promotor del virus de sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), aquellas que dirigen la expresión de la secuencia nucleotídica solo en ciertas células hospedadoras (p.ej., secuencias reguladoras específicas de tejido, véanse Voss *et al.*, 1986, Trends Biochem. Sci. 11: 287, Maniatis *et al.*, 1987, Science 236: 1237 y aquellas que dirigen la expresión inducible de una secuencia nucleotídica en respuesta a un tratamiento o afección particular (p.ej., el promotor de metalotionina en células de mamífero y el promotor sensible a tet y/o sensible a estreptomycin en sistemas tanto procarióticos como

eucarióticos (véase *id.*). Se apreciará por los especialistas en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora para transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras, produciendo así proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describen en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células hospedadoras en que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariótica (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariótica (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (p.ej., células CHO)). El ADN vectorial puede introducirse en células procarióticas o eucarióticas a través de técnicas de transformación o transfección convencionales. Para transfección estable de células de mamífero, es conocido que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usados, solo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador selectivo (p.ej., para resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (p.ej., las células que han incorporado el gen de selección sobrevivirán, mientras que las demás células mueren), entre otros métodos.

Indicaciones

En un aspecto, se dan a conocer métodos de tratamiento de un sujeto.

El método puede tener, por ejemplo, un efecto generalmente beneficioso sobre la salud del paciente, p.ej., puede aumentar la longevidad esperada del sujeto. Como alternativa, el método puede, por ejemplo, tratar, prevenir, curar, aliviar o mejorar ("tratar") una enfermedad, trastorno, afección o dolencia ("una afección"). Entre las afecciones para tratar de acuerdo con la presente invención están las afecciones caracterizadas por una expresión o actividad inapropiada de activina A. En algunas de dichas afecciones, el nivel de expresión o actividad es demasiado alto, y el tratamiento comprende administrar un antagonista de activina A como se describe en la presente memoria.

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

La afección cancerosa puede ser cualquier afección cancerosa que pueda tratarse usando las composiciones comprendidas en la presente memoria, por ejemplo anticuerpos anti-activina A o fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos de afecciones cancerosas incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer óseo por osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, tumores cerebrales (p.ej., glioma de tallo cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la ruta visual e hipotalámico), cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma de primario desconocido, de sistema nervioso central primario, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer cervicouterino, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogenosa crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de linfocitos T cutáneos, cáncer endométrico, ependimoma, cáncer esofágico, familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonádicas, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo por melanoma intraocular, cáncer de ojo por retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores de células germinales (p.ej., extracraneales, extragonádicos y ováricos), tumor trofoblástico gestacional, glioma (p.ej., de tallo cerebral en adulto e infantil, astrocitoma cerebral

infantil, de la ruta visual e hipotalámico infantil), tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (de hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma hipotalámico y de la ruta visual, melanoma intraocular, carcinoma de células de islote (de páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (de células renales), cáncer laríngeo, leucemia (p.ej., linfoblástica aguda, mieloide aguda, linfocítica crónica, mielogenosa crónica y tricoleucemia), cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de hígado, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma (p.ej., relacionado con el SIDA, de Burkitt, de linfocitos T cutáneos, de Hodgkin, no de Hodgkin y del sistema nervioso primario central), macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (de ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielogenosa, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico potencialmente poco maligno, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células de islote, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, pineoblastoma, tumor de pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (de riñón), cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salivar, sarcoma de tejido blando, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanómico, carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma escamoso, linfoma de linfocitos T cutáneos, cáncer testicular, timoma, carcinoma tímico, cáncer tiroideo, tumor trofoblástico gestacional, carcinoma de sitio primario desconocido, cáncer de sitio primario desconocido, cáncer de uretra, cáncer uterino endométrico, sarcoma uterino, cáncer vaginal, glioma de la ruta visual e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Pueden usarse anticuerpos terapéuticos que se unen específicamente a activina A intacta, en que las secuencias en la región de aproximadamente C11-S33 (primer bucle) y aproximadamente C81-E111 (segundo bucle) retienen la conformación de la activina A nativa. Dicha cartografía y unión se describen en el Ejemplo 6 siguiente.

Los anticuerpos según la invención pueden tener una afinidad de unión por activina A humana menor o igual a $1 \times 10^{-7}M$, menor o igual a $1 \times 10^{-8}M$, menor o igual a $1 \times 10^{-9}M$, menor o igual a $1 \times 10^{-10}M$, menor o igual a $1 \times 10^{-11}M$, o menor o igual a $1 \times 10^{-12}M$.

La afinidad de un anticuerpo o copartícipe de unión, así como la extensión en que un anticuerpo inhibe la unión, pueden determinarse por un especialista en la materia usando técnicas convencionales, por ejemplo aquellas descritas por Scatchard *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-672 (1949)) o por resonancia de plasmón de superficie (SPR; BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ). Para resonancia de plasmón de superficie, se inmovilizan las moléculas diana sobre una fase sólida y se exponen a ligandos en una fase móvil que pasa por una celda de flujo. Si ocurre unión de ligando a la diana inmovilizada, cambia el índice de refracción local, conduciendo a un cambio en el ángulo de SPR que puede monitorizarse instantáneamente detectando los cambios en la intensidad de la luz reflejada. Pueden analizarse las velocidades de cambio de la señal de SPR para procurar las constantes de velocidad aparente para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La relación de estos valores da la constante de equilibrio aparente (afinidad) (véase, p.ej., Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-65 (1993)).

Un anticuerpo según la presente invención puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgD o IgA. Puede obtenerse a partir de o derivar de un animal, por ejemplo aves de corral (p.ej. pollo) y mamíferos que incluyen, pero sin limitación, ratón, rata, hámster, conejo u otros roedores, vaca, caballo, oveja, cabra, camello, ser humano u otros primates. El anticuerpo puede ser un anticuerpo internalizante. La producción de anticuerpos se da a conocer en general en la publicación de patente de EE.UU. n° 2004/0146888 A1.

Ensayos de caracterización

En los métodos descritos anteriormente para generar anticuerpos según la invención, incluyendo la manipulación de CDR de A1 específicas en nuevas regiones estructurales y/o constantes, están disponibles ensayos apropiados para seleccionar los anticuerpos deseados (concretamente, ensayos para determinar la afinidad de unión a activina A; ensayos de bloqueo cruzado; ensayo de unión competitiva basado en Biacore y ensayos *in vivo*).

Métodos terapéuticos y administración de proteínas de unión a antígeno

Ciertos métodos proporcionados en la presente memoria comprenden la administración de una proteína de unión a antígeno de unión a activina A a un sujeto, reduciendo así la respuesta biológica inducida por activina A que desempeña un papel en una afección particular. Estos pueden implicar poner en contacto activina A endógena con una proteína de unión a antígeno de unión a activina A, p.ej. mediante administración a un sujeto o en un procedimiento *ex vivo*.

El término "tratamiento" engloba el alivio o prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, o la reducción de la gravedad de una enfermedad, y similares. Además, "tratamiento" se refiere además a administrar un

agente terapéutico descrito en la presente memoria para aliviar al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno en un sujeto necesitado de ello. Una proteína de unión a antígeno no tiene que efectuar una cura completa, ni erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado patológico dado, pero no tienen que anular cada manifestación de la enfermedad para ser considerados como agentes terapéuticos útiles. De forma similar, un tratamiento administrado profilácticamente no tiene que ser completamente eficaz en la prevención del inicio de una afección para constituir un agente profiláctico viable. Simplemente reducir el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o gravedad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reduciendo la probabilidad de que aparezca o empeore la enfermedad en un sujeto, es suficiente. Una realización de la invención está dirigida a la administración a un paciente de un antagonista de activina A de la invención en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora prolongada frente al valor de referencia de un indicador que refleje la gravedad del trastorno particular.

Como se entiende en el campo pertinente, se administran las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención a un sujeto necesitado de ello de manera apropiada para la indicación. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo pero sin limitación parenteral, tópica o por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica puede administrarse, por ejemplo, por vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, mediante inyección en embolada o infusión continua. Se contempla la administración localizada, p.ej. en un sitio de enfermedad o lesión, como son el suministro transdérmico y la liberación prolongada de implantes. El suministro por inhalación incluye, por ejemplo, inhalación nasal u oral, uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol y similares. Otras alternativas incluyen gotas oculares; preparaciones orales que incluyen píldoras, jarabes, comprimidos oblongos o goma de mascar y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores y pomadas.

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

Ventajosamente, se administran proteínas de unión a antígeno en forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales tales como un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo una segunda sustancia inhibidora del receptor de activina A, una sustancia antiangiogénica, una sustancia quimioterapéutica, una sustancia analgésica, etc., proporcionándose en la presente memoria ejemplos no exclusivos de los mismos. En diversas realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de la proteína de unión a antígeno de unión a activina A.

En una realización, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión a antígeno de la invención junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo consistente en un tampón, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como aquellos que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizante y un excipiente. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con seroalbúmina conespecífica son ejemplos de diluyentes apropiados. De acuerdo con las normas industriales apropiadas, pueden añadirse también conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede formularse en forma de un liofilizado usando disoluciones excipientes apropiadas (p.ej., sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Se presentan ejemplos adicionales de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª Ed. (1980) y 20ª Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Los kits para uso por facultativos médicos pueden incluir una proteína de unión a antígeno de la invención y una etiqueta u otras instrucciones para uso en el tratamiento de cualquiera de las afecciones discutidas en la presente memoria. En una realización, el kit incluye una preparación estéril de una o más proteínas de unión a antígeno, que pueden estar en forma de una composición como se da a conocer anteriormente, y pueden estar en uno o más viales.

Las dosificaciones y frecuencia de administración pueden variar según factores tales como la vía de administración, las proteínas de unión a antígeno particulares empleadas, la naturaleza y gravedad de la enfermedad para tratar, si la afección es aguda o crónica y el tamaño y condición general del sujeto. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante procedimientos conocidos en la materia pertinente, p.ej. en ensayos clínicos que pueden implicar estudios de aumento de dosis.

Puede administrarse una proteína de unión a antígeno de la invención, por ejemplo, una vez o más de una vez, p.ej. a intervalos regulares durante un periodo de tiempo. En realizaciones particulares, se administra una proteína de unión a antígeno durante un periodo de al menos un mes o más, p.ej. durante uno, dos o tres meses o incluso indefinidamente. Para tratar afecciones crónicas, el tratamiento a largo plazo es generalmente el más eficaz. Sin

embargo, para tratar afecciones agudas, puede ser suficiente la administración durante periodos más cortos, p.ej. de una a seis semanas. En general, se administra la proteína de unión a antígeno hasta que el paciente manifiesta un grado médicamente relevante de mejora frente al valor de referencia para el indicador o indicadores elegidos.

Realizaciones particulares de la presente invención implican la administración de una proteína de unión a antígeno a una dosificación de aproximadamente 1 ng de proteína de unión a antígeno por kg de peso del sujeto al día ("1 ng/kg/día") a aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 500 ng/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 µg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. En realizaciones adicionales, se administra una proteína de unión a antígeno a adultos una vez por semana, dos veces por semana o tres veces o más por semana, para tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por activina A, p.ej. un trastorno médico dado a conocer en la presente memoria. Si se inyecta, la cantidad eficaz de proteína de unión a antígeno por dosis de adulto puede oscilar de 1-20 mg/m², y es preferiblemente de aproximadamente 5-12 mg/m². Como alternativa, puede administrarse una dosis fija; la cantidad puede oscilar de 5-100 mg/dosis. Es un intervalo para una dosis fija aproximadamente 20-30 mg por dosis. En una realización, se administra repetidamente por inyección una dosis fija de 25 mg/dosis. Si se usa una vía de administración distinta de la inyección, se ajusta apropiadamente la dosis de acuerdo con las prácticas médicas estándares. Un ejemplo de régimen terapéutico implica inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de proteína de unión a antígeno de una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado de mejora deseado. Para sujetos pediátricos (de 4-17 años de edad), un régimen ejemplarmente adecuado implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg hasta una dosis máxima de 25 mg de proteína de unión a antígeno administrada dos o tres veces por semana.

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

Los ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en la presente memoria comprenden la inyección subcutánea de una proteína de unión a antígeno una vez por semana, a una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar una afección en la que la señalización de activina A desempeña un papel. Se proporcionan en la presente memoria ejemplos de dichas afecciones e incluyen, por ejemplo, caquexia, cáncer, artritis reumatoide y todas las afecciones en que la pérdida de peso corporal, masa corporal, grasa corporal o incapacidad de mantener el peso corporal, masa corporal o grasa corporal desempeñen un papel. La administración semanal de proteína de unión a antígeno continúa hasta conseguir el resultado deseado, p.ej. la remisión de los síntomas del sujeto. El tratamiento puede reanudarse según sea necesario o, como alternativa, pueden administrarse dosis de mantenimiento.

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

En otra realización, se administra una proteína de unión a antígeno al sujeto en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora, preferiblemente una mejora prolongada, de al menos un indicador que refleje la gravedad del trastorno que se está tratando. Pueden valorarse diversos indicadores que reflejan la extensión de la dolencia, enfermedad o afección del sujeto para determinar si la cantidad y tiempo de tratamiento son suficientes. Dichos indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de la gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización, una mejora se considera prolongada si el sujeto exhibe la mejora en al menos dos ocasiones separadas por dos a cuatro semanas. El grado de mejora se determina generalmente por un médico, que hace la determinación basándose en los signos, síntomas, biopsias u otros resultados de pruebas, y que puede emplear también cuestionarios que se administran al sujeto, tales como cuestionarios de calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

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

Realizaciones particulares de composiciones de la invención implican el uso de una proteína de unión a antígeno y uno o más antagonistas de activina A adicionales, por ejemplo dos o más proteínas de unión a antígeno de la invención, o una proteína de unión a antígeno de la invención y uno o más antagonistas de activina A distintos. En

realizaciones adicionales, se administra la proteína de unión a antígeno sola o en combinación con otros agentes útiles para tratar la afección con que está aquejado el paciente. Los ejemplos de dichos agentes incluyen tanto fármacos proteicos como no proteicos. Cuando se coadministran múltiples terapias, las dosificaciones pueden ajustarse en consecuencia, como es reconocido en la materia pertinente. "Coadministración" y terapia de combinación no están limitadas a la administración simultánea, sino que también incluyen regímenes de tratamiento en que se administra una proteína de unión a antígeno al menos una vez durante un curso de tratamiento que implica administrar al menos otro agente terapéutico al paciente.

Los ejemplos de otros agentes que pueden coadministrarse con una proteína de unión a antígeno son otras proteínas de unión a antígeno o polipéptidos terapéuticos que se eligen según la afección particular para tratar. Como alternativa, pueden coadministrarse con un antagonista de activina A fármacos no proteicos que sean útiles en el tratamiento de una de las afecciones particulares discutidas anteriormente.

Terapia de combinación

Se da a conocer un método de tratamiento de un sujeto con una proteína de unión a antígeno inhibidora de activina A y uno o más de otros tratamientos. Dicha terapia de combinación puede conseguir sinergia o un efecto aditivo, por ejemplo, atacando múltiples sitios o dianas moleculares en un tumor. Los tipos de terapias de combinación que pueden usarse en relación con la presente invención incluyen la inhibición o activación (según sea apropiado) de múltiples nodos en una ruta relacionada con una sola enfermedad, múltiples rutas en una célula diana y múltiples tipos celulares en un tejido diana (p.ej. en un tumor). Por ejemplo, puede combinarse un inhibidor de activina A de la presente invención con un tratamiento que promueva la apoptosis o inhiba la angiogénesis. En otra realización, podría usarse un agente orientado que, cuando se usa por sí mismo, no consigue desencadenar un efecto terapéuticamente deseado, por ejemplo, para sensibilizar a células cancerosas o aumentar el efecto de tratamiento de otros agentes. En otra realización, se usa un inhibidor de activina A según la invención en combinación con un fármaco citotóxico u otro agente orientado que induzca la apoptosis. En otra realización, se usa un inhibidor de activina A en combinación con uno o más agentes que inhiben diferentes dianas que están implicadas en la supervivencia celular (p.ej., PKB, mTOR), diferentes tirosina cinasas receptoras (p.ej., ErbB1, ErbB2, c-Met, c-kit), o diferentes tipos celulares (p.ej., inhibidores de KDR, c-fm). En otra realización, se añade un inhibidor de activina A de la invención al tratamiento de referencia existente para una afección particular. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, gemcitabina, taxol, Taxotere y CPT-11.

En otra realización, el método comprende administrar uno o más de los antagonistas de activina A descritos en la presente memoria y uno o más de otros tratamientos (p.ej., un tratamiento terapéutico o paliativo), por ejemplo tratamientos anticancerosos (tales como cirugía, ultrasonidos, radioterapia, quimioterapia o tratamiento con otro agente anticanceroso). Cuando un método comprende administrar más de un tratamiento a un sujeto, ha de entenderse que el orden, momento, número, concentración y volumen de las administraciones está limitado solo por los requisitos médicos y limitaciones del tratamiento, concretamente pueden administrarse al sujeto dos tratamientos, p.ej., simultánea, consecutiva, alternadamente o según cualquier otro régimen. Los ejemplos de agentes que pueden administrarse en combinación con los antagonistas de activina A descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación: agentes estimulantes de neutrófilos, irinotecán, SN-38, gemcitabina, herstatina o un derivado de herstatina de unión a activina A (como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. n° 05/0272637), AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), HERCEPTIN® (Genentech), RITUXAN® (Genentech), ARIMIDEX® (AstraZeneca, Wilmington, DE), IRESSA® (AstraZeneca), BEXXAR® (Corixa, Seattle, WA), ZEVALIN® (Biogen Idec, Cambridge, MA), ERBITUX® (Imclone Systems Inc., New York, NY), GEMZAR® (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), CAMPTOSAR® (Pfizer, Nueva York, NY), GLEEVEC® (Novartis), SU-11248 (Pfizer), BMS-354825 (Bristol-Myers Squibb), panitumumab (Abgenix, Fremont, CA/Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) y denosumab (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

El desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para uso de las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo p.ej. administración y formulación subcutánea, oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular, es bien conocido en la materia, algunos de los cuales se discuten brevemente a continuación con fines generales de ilustración.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente memoria pueden suministrarse mediante administración oral a un animal. Como tales, dichas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente al alimento de la dieta.

En ciertas circunstancias, será deseable suministrar las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente memoria por vía subcutánea, parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichos enfoques son bien conocidos por el especialista en la materia, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.543.158; la patente de EE.UU. n° 5.641.515 y la patente de EE.UU. n° 5.399.363. En ciertas realizaciones, pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Pueden prepararse también dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contendrán

generalmente un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. nº 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede facilitarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para administración parenteral en una disolución acuosa, la disolución debería tamponarse adecuadamente si es necesario y volverse primero isotónico el diluyente líquido con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, será conocido por los especialistas en la materia a la vista de la presente divulgación el medio acuoso estéril que puede emplearse. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hiperdermoclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª ed., pág. 1035-1038 y 1570-1580). Aparecerá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. Además, para administración humana, las preparaciones satisfarán por supuesto preferiblemente las normas de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales requeridas por las normas de la FDA Office of Biologics.

En otra realización de la invención, las composiciones dadas a conocer en la presente memoria pueden formularse en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares. Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz.

Los portadores pueden comprender además todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, disoluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también a las composiciones ingredientes activos suplementarios. La frase "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o indeseada similar cuando se administran a un ser humano.

En ciertas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones de la presente invención en células/organismos hospedadores adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para suministro encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanosfera o una nanopartícula o similar. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden unirse, covalente o no covalentemente, a la superficie de dichos vehículos portadores.

La formación y uso de liposomas y preparaciones similares a liposomas como portadores farmacéuticos potenciales son generalmente conocidos por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Lasic, Trends Biotechnol. 16(7): 307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3): 691-95, 1998; Chandran *et al.*, Indian J. Exp. Biol. 35(8): 801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3): 233-61, 1995; patente de EE.UU. nº 5.567.434; patente de EE.UU. nº 5.552.157; patente de EE.UU. nº 5.565.213; patente de EE.UU. nº 5.738.868 y patente de EE.UU. nº 5.795.587). El uso de liposomas no parece estar asociado a respuestas autoinmunitarias de toxicidad inaceptable después del suministro sistémico. En ciertas realizaciones, se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también llamadas vesículas multilamelares (VML)).

Como alternativa, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de modo estable y reproducible (véanse, por ejemplo, Quintanar-Guerrero *et al.*, Drug

Dev. Ind. Pharm. 24(12): 1113-28, 1998). Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) pueden diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Dichas partículas pueden elaborarse como se describe, por ejemplo, en Couvreur *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5(1): 1-20, 1988; zur Muhlen *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45(2): 149-55, 1998; Zambaux *et al.*, J. Controlled Release 50(1-3): 31-40, 1998 y la patente de EE.UU. nº 5.145.684.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden disponerse en envases, junto con material de empaquetado que proporciona instrucciones referentes al uso de dichas composiciones farmacéuticas. Generalmente, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describa la concentración de reactivo, así como en ciertas realizaciones, las cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (p.ej., agua, disolución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

La dosis administrada puede oscilar de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal. Como resultará evidente para un especialista en la materia, la cantidad y frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación que se esté tratando, de la respuesta deseada, de la condición del paciente y demás. Típicamente, las composiciones pueden administrarse mediante una variedad de técnicas, como se observa anteriormente.

Se da a conocer también un kit de diagnóstico que comprende al menos un agente de unión anti-activina A según la presente invención.

Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes:

(1) instrucciones para uso del uno o más agentes de unión para cribado, diagnóstico, pronóstico, monitorización terapéutica o cualquier combinación de estas aplicaciones;

(2) un copartícipe de unión marcado del agente o agentes de unión anti-activina A;

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

(4) una etiqueta o inserto que indica la aprobación reguladora para cribado, diagnóstico, pronóstico o uso terapéutico o cualquier combinación de los mismos.

Si no se proporciona un copartícipe de unión marcado al agente o agentes de unión, el agente o agentes de unión mismos pueden marcarse con uno o más marcadores detectables, p.ej. un resto quimioluminiscente, enzimático, fluorescente o radiactivo.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE ACTIVINA A

Ultrafiltración y diafiltración (UF/DF) de medios acondicionados. Se expresó activina A R-Hu en células de ovario de hámster chino (CHO). Se desarrollaron una serie de etapas para generar material activo purificado. El proceso de purificación empezó mediante la concentración (diafiltración) de los medios acondicionados (CM) entre 15 y 20 veces usando un cartucho espiral Amicon S10Y10. Se intercambió entonces el tampón de los medios (se diafiltró) usando 5 volúmenes de tampón tris 10 mM a pH 7,0, se filtró y se almacenó.

Cromatografía de intercambio catiónico. Se aplicó activina A r-Hu a 5 ml/minuto a 4-80 °C a una columna S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) de 2,6 X 7 cm equilibrada con tampón Tris 10 mM a pH 7,0. Se lavó la columna con el tampón de equilibrado. Se eluyó la activina A r-Hu de la columna con un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio 0,4 M durante 20 volúmenes de columna tamponado con Tris 10 mM a pH 7,0. Se agruparon las fracciones apropiadas y se almacenaron a 4-80 °C.

Cromatografía HPLC C4 en fase inversa. Se ajustó el pH del agrupamiento de columna S-Sepharose a 2,0 con ácido trifluoroacético (TFA). Se aplicó entonces el agrupamiento a una columna Vydac C4 de 1 X 25 cm a temperatura ambiente equilibrada con 75 % de tampón A (0,1 % de TFA en agua) y 25 % de tampón B (90 % de acetonitrilo, 0,1 % de TFA, 9,9 % de agua). Se lavó entonces la columna con el tampón de equilibrado. Se eluyó la activina A R-Hu con un gradiente de 25 % de tampón B a 50 % de tampón B durante 50 minutos a un caudal de 5 ml/minuto. Se agruparon las fracciones apropiadas y se liofilizaron.

Cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución. Se equilibró una columna S-Sepharose de alta resolución de 5 ml con urea 8 M, fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 (tampón A) a temperatura ambiente. Se resuspendió el agrupamiento de C4 liofilizado en tampón A, se aplicó a 5 ml/minuto y se lavó con tampón A. Se eluyó la activina A r-

Hu de la columna con un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio a 0,15 M durante 30 volúmenes de columna tamponado con urea 8 M, fosfato de sodio 10 mM a pH 7,0. Se agruparon las fracciones apropiadas y se almacenaron a 4-80 °C.

- 5 Cromatografía HPLC C4 en fase inversa. Se ajustó el pH del agrupamiento de columna S-Sepharose a 2,0 con ácido trifluoroacético (TFA). Se aplicó entonces el agrupamiento a una columna Vydac C4 de 1 X 25 cm a temperatura ambiente equilibrada con 75 % de tampón A (0,1 % de TFA en agua) y 25 % de tampón B (90 % de acetonitrilo, 0,1 % de TFA, 9,9 % de agua). Se lavó entonces extensamente la columna para retirar la urea y sales con el tampón de equilibrado. Se eluyó la activina A R-Hu con un gradiente de 25 % de tampón B a 50 % de tampón B durante 50 minutos a un caudal de 5 ml/minuto. Se agruparon las fracciones apropiadas, se liofilizó la activina A r-Hu purificada
- 10 final y se almacenó en alícuotas a -80 °C. La SEQ ID NO:225 proporciona la secuencia aminoacídica de la activina A.

EJEMPLO 2**GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS ANTI-ACTIVINA A**

Se crearon anticuerpos de activina A en ratones XenoMouse® (Abgenix, Fremont, Calif.), que son ratones que contienen genes de inmunoglobulina humana. Se usó la cepa XenoMouse® XMG2 para producir anticuerpos de kappa de IgG2 totalmente humanos. Se usó una segunda cepa para producir anticuerpos de kappa de IgG4 totalmente humanos. Se inmunizaron los ratones con activina A.

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

Se extrajo sangre de cada ratón dos días después de la sexta inyección. Se ensayaron las muestras de sangre de esas extracciones por ELISA para determinar el título de anticuerpos de activina A. Cuatro días después de la inyección final, se sacrificaron los ratones, se recolectaron sus nódulos linfáticos de drenaje y se recuperaron los linfocitos. Se agruparon separadamente los linfocitos de los ratones de cada uno de los tres grupos. Para enriquecer las muestras de linfocitos en linfocitos B, se agotaron los linfocitos T añadiendo perlas magnéticas anti-CD90 (Miltenyi Biotec nº de cat. 491-01) y pasando entonces los linfocitos a través de una columna LS⁺ (Miltenyi Biotec nº de cat. 424-01).

Se fusionó entonces cada una de las muestras de linfocitos enriquecidos en linfocitos B con células de mieloma P3 usando un dispositivo de fusión Electrocult (Genetronic, Inc., Model ECM 2001), creando hibridomas. Se sembraron entonces los tres grupos de estirpes de hibridoma fusionado en medios de hibridoma en placas de 96 pocillos como se ha descrito (documento WO 2005/094879), aunque pueden usarse otros medios adecuados conocidos en la materia. Se cultivaron las estirpes de hibridoma durante 14 días a 37 °C en 15 % de CO₂.

Después de 14 días, se ensayaron por ELISA los sobrenadantes de cultivo para detectar la presencia de anticuerpos de IgG humana de activina A. En los sobrenadantes de cultivo que probaron ser positivos en ese ELISA, se ensayó la presencia de la cadena kappa humana en un segundo ELISA. En ese segundo ELISA, las condiciones eran idénticas al primer ELISA, excepto porque el anticuerpo secundario era un anticuerpo de cadena kappa de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante. Los hibridomas que probaron ser positivos en ambos ensayos ELISA se expandieron adicionalmente, produciendo 5 ml de sobrenadante para ensayo posterior.

Se cribaron un total de 160 muestras de hibridoma anti-activina A derivado de xenorratones usando un ensayo funcional basado en células y análisis de unión BIAcore como se describe en los Ejemplos siguientes. Se caracterizaron adicionalmente en 23 hibridomas sus propiedades relacionadas con la expresión, purificación, ensayo basado en células, análisis de unión, análisis de secuencia, EM y SEC. De estos, se identificaron tres potentes AcM, A1, A2 y A3, para ensayo adicional como se describe a continuación. Las secuencias aminoácídicas para estos anticuerpos son como sigue: A1 SEQ ID NO:9 (variable de cadena ligera); SEQ ID NO:84 (constante de cadena ligera); SEQ ID NO:10 (variable de cadena pesada) y SEQ ID NO:214 (constante de cadena pesada); A2 SEQ ID NO:25 (variable de cadena ligera); SEQ ID NO:100 (constante de cadena ligera); SEQ ID NO:26 (variable de cadena pesada) y SEQ ID NO:215 (constante de cadena pesada); A3 SEQ ID NO:41 (variable de cadena ligera); SEQ ID NO:108 (constante de cadena ligera); SEQ ID NO:42 (variable de cadena pesada) y SEQ ID NO:221 (constante de cadena pesada);

EJEMPLO 3**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ACTIVINA A HU HUMANA EN CÉLULAS CHO**

Las células CS-9 usadas para la transfección de los plásmidos de expresión anti-activina A hu eran una estirpe celular CHO en suspensión libre de suero. Se seleccionó el clon CS-9 como la estirpe celular hospedadora para la expresión de proteínas recombinantes y se depositó en medio libre de suero. Se ensayaron en el depósito los agentes accidentales y la esterilidad y se encontró que estaba libre de agentes víricos, micoplasmáticos y microbianos.

Se aumentaron de escala las estirpes celulares que expresan anti-activina A hu usando un proceso de carga por lotes típico. Se inocularon las células en un biorreactor Wave tras expansión. Se alimentó el cultivo tres veces aproximadamente el día 3, día 5 y día 9 con alimentaciones en bolo y se recolectaron el día 11. Se centrifugaron las células y se filtraron los medios acondicionados a través de un prefiltro de 25,4 cm de 0,45/0,2 micrómetros, seguido de filtración a través de un filtro de 15,24 cm de 0,2 micrómetros.

Purificación de AcM de medios acondicionados de hibridoma (C.M.):

Se añadieron a entre 7 y 10 ml of C.M. 100 µl de una suspensión 1:2 de resina Mab Select equilibrada con PBS. Se

pusieron los tubos en rotores a 4-8 °C durante una noche. Se centrifugaron los tubos a 1.000 X g durante 5 minutos y se decantó la fracción no unida. Se lavó la resina con 5 ml de PBS, se centrifugó y decantó como anteriormente. Se transfirió la resina entonces a un tubo SPIN-X de 0,45 µm de 2 ml. Se lavó la resina dos veces adicionales con 0.5 ml de PBS y se centrifugó. Se eluyeron los AcM con 0,2 ml de ácido acético 0,1 M mediante incubación a temperatura ambiente con mezclado ocasional durante 10 minutos. Se centrifugaron los tubos y se añadieron 30 µl de tampón Tris 1 M a pH 8,0 al eluido. Se almacenaron los AcM purificados a 4-8 °C.

EJEMPLO 4

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE ACTIVINA BASADO EN CÉLULAS C2C12

Este ensayo demuestra la capacidad neutralizante de la activina A del anticuerpo que se está ensayando mediante la medida de la extensión en que se inhibe la unión de activina A a su receptor. Se generó una estirpe celular informadora sensible a activina mediante transfección de células mioblásticas C2C12 (ATCC n°: CRL-1772) con un constructo pMARE-luc. El constructo pMARE-luc se elaboró clonando doce repeticiones de la secuencia CAGA, que representan los elementos sensibles a activina (Dennler *et al.* *EMBO* 17: 3091-3100 (1998)), en un vector informador pLuc-MCS (Stratagene n° de cat. 219087) en dirección 5' de la secuencia TATA. Las células mioblásticas C2C12 expresan naturalmente receptores IIB de activina (actRIIB) sobre la superficie celular. Cuando la activina se une a los receptores celulares, se activa la ruta de Smad y se une la Smad fosforilada al elemento de respuesta (Macias-Silva *et al.* *Cell* 87: 1215 (1996)), dando como resultado la expresión del gen de luciferasa. Se mide entonces la actividad de luciferasa usando un kit de ensayo informador de luciferasa comercial (n° de cat. E4550, Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante.

Se usó una estirpe estable de células C2C12 que se habían transfectado con pMARE-luc (C2C12/pMARE clon n° 44) para medir la actividad de activina según el siguiente procedimiento.

Se sembraron iguales números de células informadoras (C2C12/pMARE clon n° 44) en cultivos de 96 pocillos. Se efectuó una primera ronda de cribado usando dos diluciones de medio de acondicionamiento que contiene anticuerpos con la concentración de activina A fijada en 4 nM. Se preincubó la activina A madura recombinante durante 1 hora a temperatura ambiente con medio de acondicionamiento a diluciones 2 x y 5 x, respectivamente. Se trató el cultivo celular informador con activina con o sin anticuerpos durante seis horas. Se midió la actividad de activina A determinando la actividad de luciferasa en los cultivos tratados. Se usó este ensayo para identificar inicialmente anticuerpos que inhibían la actividad señalizadora de activina A en el ensayo informador. Posteriormente, se generó una curva de titulación de nueve puntos con la concentración de activina A fijada en 4 nM. Se preincubó la activina A con cada una de las siguientes nueve concentraciones de anticuerpos purificados: 0,004 nM, 0,04 nM, 0,4 nM, 4 nM, 20 nM, 40 nM, 200 nM, 400 nM y 2 µM durante una hora antes de añadir la mezcla al cultivo celular informador. Los valores de CI_{50} eran para una serie de anticuerpos A1, A2 y A3 y se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3

AcM	CI_{50} celular (nM)
A1	<3
A2	<3
A3	<3

EJEMPLO 5

ENSAYO BIACORE®

Se efectuó un análisis de afinidad de los anticuerpos A1, A2 y A3 de activina A en un aparato Biacore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) usando el chip sensor CM5 y tensioactivo P20 al 0,005 % (Biacore, Inc.) como tampón de paso. Se inmovilizó proteína activina A madura recombinante en un chip sensor CM5 de pureza analítica (Biacore, Inc.) a través de los grupos amina primarios usando el kit de acoplamiento de amina (Biacore, Inc.) según el protocolo sugerido por el fabricante.

Se usaron ensayos de unión directa para cribar en anticuerpos su capacidad de unirse a activina A inmovilizada. Se llevaron a cabo los ensayos de unión mediante la inyección de dos concentraciones (40 y 400 nM) de cada anticuerpo candidato en la superficie de activina A inmovilizada a un caudal de 50 µl/min durante 3 minutos. Después de un tiempo de disociación de 3 minutos, se regeneró la superficie. Se comparó cualitativamente en las curvas de unión la intensidad de señal de unión, así como las velocidades de disociación. Se determinaron los parámetros cinéticos del anticuerpo, incluyendo k_a (constante de la velocidad de asociación), k_d (constante de la

velocidad de disociación) y KD (constante del equilibrio de disociación) usando el programa informático BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). Cuanto menores son las constantes de equilibrio de disociación (expresadas en nM), mayor es la afinidad del anticuerpo por activina A.

EJEMPLO 6

5 CARTOGRAFÍA DE LA REGIÓN DE UNIÓN A ACTIVINA A PARA ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se determinaron las regiones de unión a anticuerpo en la activina A usando múltiples métodos bioquímicos, incluyendo Western en condiciones reductoras o no reductoras, digestión limitada con proteasa usando LysC, análisis peptídico por EM y competición peptídica usando BIAcore.

Los nudos de Cys son características estructurales clave para miembros de la familia de TGF- β . La rotura de S-S con un agente reductor deterioraba la estructura de la activina A y disminuía la unión de activina A a anticuerpos neutralizantes, incluyendo A-1. Estos datos demostraban que los nudos de Cys son importantes para la unión de activina A con estos anticuerpos neutralizantes, que se unen específicamente a activina A en comparación con activina B. Los nudos de Cys hacen dos bucles distantes de secuencias estructuralmente adyacentes entre sí. Estas dos regiones son una secuencia en la región de aproximadamente C11-S33 (primer bucle) y aproximadamente C81-E111 (segundo bucle) de activina A (Figura 7). Una digestión limitada con LysC reveló que estas dos regiones se protegían por el anticuerpo A-1, indicando que interaccionan con los anticuerpos neutralizantes directamente. Los anticuerpos neutralizantes son sensibles a los cambios conformacionales de la activina A, sugiriendo que se unen a epítomos no lineales del antígeno. Análisis peptídicos adicionales han indicado que los fragmentos G-1 a K7 y S57-F74 de la activina A no son necesarios para su unión con los anticuerpos neutralizantes directamente. La comparación de la secuencia de activina A en comparación con activina B muestra que algunas de las diferencias de secuencia aparecen en esta región.

EJEMPLO 7

ENSAYOS DE SELECTIVIDAD

Se efectuaron estos ensayos usando la tecnología BIAcore®, para determinar la selectividad de unión de los anticuerpos A1, A2 y A3 con diversas activinas y otros miembros de la familia de TGF- β , incluyendo activina A, activina B, activina AB, inhibina A, GDF-8, GDF-11, TGF- β -1, TGF- β -3 y BMP4 (todos de R & D Systems). Se acopló covalentemente ActRIIB/Fc con chips sensores de pureza analítica según el protocolo sugerido por el fabricante. Debido a que los ensayos BIAcore detectan cambios en el índice de refracción, la diferencia entre la respuesta detectada con inyección sobre superficies de receptor inmovilizado en comparación con la respuesta detectada con inyección sobre la superficie de control en ausencia de cualquier anticuerpo representa la unión real de diversos ligandos al receptor. Con la preincubación de anticuerpos y activina y moléculas de TGF- β , el cambio (aumento o disminución) de la respuesta de unión indica unión de anticuerpo a la familia TGF β de moléculas. Los anticuerpos se unen todos a activina A, pero no a activina B, GDF-8, GDF-11, TGF- β -1, TGF- β -3 y BMP4, indicando por tanto especificidad por activina A.

35 EJEMPLO 8

ENSAYOS DE EQUILIBRIO KINEX A™

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

50 EJEMPLO 9

EFFECTOS PROTECTORES DE ANTI-ACTIVINA SOBRE EL PESO CORPORAL Y LA PÉRDIDA DE MASA MUSCULAR EN UN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO

Se diseñó este ejemplo para probar si los inhibidores de activina pueden recuperar la afección debilitante muscular observada en artritis inducida por colágeno. La artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo de ratón ampliamente usado que comparte varios rasgos clínicos y patológicos con la artritis reumatoide (AR). El mecanismo

preciso de la AIC no es conocido, sin embargo existen considerables evidencias que sugieren que la AIC es una enfermedad inflamatoria mediada por Th-1. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria común que conduce a inflamación de las articulaciones y erosión progresiva de cartílago/hueso. Incluso si la progresión de la AR está bajo control, la pérdida de MCC no se corrige sin intervención directa adicional.

- 5 Se preparó el modelo de artritis inducida por colágeno como sigue. se usaron ratones DBA/1J macho (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de 8 semanas de edad (20-23 g). Se llevó a cabo la inmunización el día 1 y el día 21 mediante inyección de 1000 g de colágeno bovino II (Chondrex, Redmond, WA), emulsionado en 100 µl de CFA o ICFA, por vía intradérmica en la base de la cola. Se usaron tres grupos de diez ratones cada uno. El grupo 1 (control) recibió vehículo solo. El grupo 2 (experimental, inyección de colágeno) recibía vehículo solo como tratamiento. El
- 10 Grupo 3 se inyectó con colágeno y se trató con anticuerpo anti-activina A1.

El índice clínico artrítico usado fue:

0= articulación normal sin signos de artritis

1= hinchazón y/o rojez de un dedo

2= dos articulaciones implicadas

- 15 3= más de dos articulaciones

4= artritis grave de toda la pata y dedos

El tratamiento consistía en una inyección de anticuerpo de activina (s.c.) empezando el día 8, de 5 mg/kg, s.c. dos veces por semana. Los criterios de valoración medidos fueron peso corporal, masa muscular/grasa, ingesta de alimento y citocinas inflamatorias.

- 20 Peso corporal. Los animales con AIC no tratados perdieron un 25 % de su peso corporal y masa muscular en comparación con los animales normales, lo que proporcionó la evidencia de caquexia reumatoide. Los tratamientos con anti-activina A (A-1) aumentaron significativamente ($p < 0,05$) el peso corporal en comparación con el de control con AIC, pero no con los animales de control normales.

- 25 Masa muscular. El tratamiento con anticuerpo monoclonal A1 aumentaba significativamente la masa muscular ($p < 0,05$) en animales con AIC, en comparación con animales con AIC no tratados. En los controles con AIC, la masa muscular a los 95 días era de 1,5 g; mientras que en los animales con AIC tratados con el anticuerpo la masa muscular a los 95 días era de 2,5 g. Se muestran los resultados en la Figura 1.

Masa grasa: El anticuerpo anti-activina A no revertía la pérdida de grasa en animales con AIC. Se muestran los resultados en la Figura 2.

- 30 La conservación del peso corporal y masa muscular en los animales tratados proporciona apoyo para los anticuerpos de activina A como terapia para mejorar la calidad de vida y rebajar la mortalidad en pacientes de artritis reumatoide.

EJEMPLO 10

XENOINJERTO INTRAMUSCULAR DE CHO/ACTIVINA EN RATONES ATÍMICOS ADULTOS JÓVENES

- 35 Se implantaron células CHO transfectadas establemente con activina A (CHO/activina) en ratones CD1 nu/nu jóvenes adultos a través de una inyección intramuscular a diversas dosis, 1×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 . Se inyectó la misma dosis de células CHO no transfectadas en grupos separados de ratones como controles. La implantación de CHO/activina inducía una pérdida de peso corporal rápida y drástica en comparación con los controles.

- 40 El día 12, el grupo de CHO/control de 1×10^6 células tenía una pérdida del 10 % del peso corporal, mientras que el grupo de CHO/anti-activina A tenía una ganancia del 10 % del peso corporal. Los grupos anti-activina A de 5×10^6 y 10×10^6 células mostraban también aumentos de peso corporal de aproximadamente un 10 %, mientras que los grupos de control de 5×10^6 y 10×10^6 células perdían un 25-30 % del peso corporal.

- 45 Se midieron los niveles de activina A sérica en ratones el día 12 después de la implantación del xenoinjerto. Los niveles de activina A sérica en ratones de control implantados con CHO originales eran < 2 ng/ml. En contraposición, los ratones portadores de xenoinjerto de CHO/activina mostraban una activina A sérica drásticamente elevada. Había una correlación significativa entre el nivel de activina A sérica y la gravedad de la pérdida de peso corporal como se indica por el análisis estadístico, indicando que la sobreexpresión de activina A es responsable de la pérdida de peso corporal observada en los ratones con xenoinjerto de CHO/activina.

- 50 Se implantó en ratones ($n = 14$ por grupo) xenoinjerto de CHO/activina y posteriormente se inyectaron vehículo o cada uno de los tres anticuerpos monoclonales anti-activina A, A1, A2 y A3. 12 de los 14 ratones en el grupo de vehículo habían muerto el día 25 después de la implantación de CHO/activina, mientras que solo 1 de los 42 ratones

implantados con CHO/activina en los grupos de tratamiento con AcM anti-activina A habían muerto en ese tiempo. Para el día 38, la mayoría de los ratones de los grupos de tratamiento de AcM seguían sobreviviendo bien, con tasas de supervivencia como siguen: 13 de los 14 del grupo A1 y 10 de los 14 del grupo A2 o A3.

- 5 Los datos de peso corporal muestran que el tratamiento con AcM anti-activina A, A1 o A2, evitaba completamente la pérdida de peso corporal en ratones portadores de xenoinjerto de CHO/activina, indicando que los AcM anti-activina eran eficaces para neutralizar la actividad de activina A *in vivo*. Como se muestra en la Figura 3, los datos de RMN revelaban que el tratamiento con el AcM anti-activina A A1 evitaba la pérdida progresiva de masa corporal magra observada en ratones portadores de CHO/activina. El tratamiento con este anticuerpo causaba también un aumento de la ingesta de alimento.
- 10 Los datos de necropsia indican que el tratamiento con el AcM anti-activina A, A1 y A2, prevenía la grave reducción de los pesos magros de la canal observada en ratones portadores de CHO/activina (Tabla 5). Los datos de necropsia terminal indican que el tratamiento con el AcM anti-activina A, A1 y A2, prevenía la grave reducción de la masa grasa observada en ratones portadores de xenoinjerto de CHO/activina (Tabla 5).
- 15 Se analizó el porcentaje de animales portadores de un tumor visible en el sitio de xenoinjerto durante la necropsia terminal el día 12 después de la implantación de CHO/activina. Como se muestra en la Tabla 5, los datos revelaban que un 80 % de los ratones en el grupo de vehículo desarrollaban tumores de xenoinjerto visualmente identificables en el sitio de inyección. Se observó una tasa significativamente disminuida de formación de tumor visible en los grupos de tratamiento con AcM anti-activina A.
- 20 Tras la necropsia, se extirparon todos los tumores visualmente identificables en los sitios de xenoinjerto de CHO/activina de los animales y se pesaron. Se observó una disminución significativa de la masa tumoral en el grupo de tratamiento con AcM de activina A en comparación con el grupo de vehículo (Tabla 5).

Tabla 5

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

- 25 Los anteriores experimentos sobre el desarrollo de tumores de xenoinjerto condujeron a varias conclusiones respecto al uso de anticuerpos anti-activina A para mejorar la supervivencia del cáncer. La activina A desempeñaba un papel causal en el desarrollo del síndrome de caquexia en ratones atímicos portadores de xenoinjerto de CHO/activina. La pérdida de peso corporal se correlacionaba bien con el aumento del nivel de activina sérica en este modelo. Los AcM anti-activina prevenían la pérdida de peso corporal y el síndrome de caquexia observados en ratones portadores de tumor de xenoinjerto de CHO/activina. Los AcM anti-activina A suprimían el crecimiento del xenoinjerto, reduciendo significativamente así el porcentaje de ratones portadores de tumores de xenoinjerto visibles, así como disminuyendo los tamaños de los tumores de xenoinjerto. Los AcM anti-activina A prevenían la muerte resultante del xenoinjerto de CHO/activina, promoviendo notablemente la supervivencia animal.
- 30

EJEMPLO 11

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-ACTIVINA A1 EN RATONES AAV-ACTIVINA

- 35 La sobreexpresión postnatal de activina A conducía a síndrome consuntivo similar a caquexia grave en ratones C57Bl/6. El peso corporal disminuía a lo largo de los días 1, 4, 9 y 11, yendo de 16 gramos a 14, 12,5 y finalmente 10,5 gramos el día 11. Había también una pérdida de peso graso, peso magro de la canal y peso de músculo gastrocnemio.

Para determinar si el anticuerpo dirigido a activina A podía aliviar o prevenir los efectos de la activina A, se

efectuaron los siguientes experimentos. Se inyectaron AAV-activina o vector AAV vacío (control) a 1×10^{13} ufp/ratón en ratones C57Bl/6 macho de 8 semanas de edad ($n=10-12$) por la vena de la cola. La Figura 5 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal A1 anti-activina A sobre el cambio de peso corporal en ratones transducidos los días 1, 5, 8 y 12. El anticuerpo prevenía el cambio de peso corporal observado en los ratones de control. El tratamiento con anticuerpo mejoraba la ingesta de alimento en este modelo animal.

EJEMPLO 12

EFFECTO PROTECTOR DE ACM ANTI-ACTIVINA A FRENTE A PÉRDIDAS DE PESO CORPORAL Y MASA MAGRA EN EL MODELO DE CAQUEXIA POR CÁNCER COLON-26

Este ejemplo demuestra el efecto conservador de músculo del anticuerpo monoclonal A-1 anti-activina A en un modelo de caquexia por cáncer en mûrido. El modelo de caquexia por cáncer se estableció usando inoculación de células de adenocarcinoma de colon 26 de mûrido singénicas en ratones CDF1 macho de 8,5 semanas de edad ($0,5 \times 10^5$ células/ratón) el día 0. Se inició el tratamiento con AcM A-1 anti-activina A (10 mg/kg, sc) el día 4, y se procuró 3 veces por semana durante 18 días. Se usó tampón de acetato de sodio (acetato de sodio 10 mM, 5% de sacarosa, pH 5,0) como vehículo en los ratones del grupo de control portadores de tumor. Se usó un grupo de edad y peso coincidentes de ratones CDF1 normales sin tumores como control de valor de referencia paralelo. Se monitorizaron el peso corporal y la ingesta de alimento tres veces por semana. Se midió el tamaño tumoral tres veces por semanas con calibres digitales. Se midió la composición corporal usando RMN al inicio y al final del estudio para monitorizar los cambios de masa magra y grasa. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones en una cámara de CO₂. Se recogieron muestras del bloque terminal y se analizaron los niveles de activina A sérica por ELISA. Se pesaron las canales magras y se registraron, y se pesaron los músculos gastrocnemios y tumores y se guardaron apropiadamente.

Se expresaron todos los resultados como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Se efectuó una prueba de T no pareada para determinar la significancia estadística entre grupos usando el software Graph Pad Prism. Se representó la significancia estadística por valores de p menores de 0,05.

Los datos muestran que los ratones tratados con A-1 tenían un peso corporal significativamente mayor que los ratones tratados con vehículo ($21,30 \pm 0,54$ g frente a $19,21 \pm 0,38$ g, $P<0,05$, día 15 y $19,66 \pm 0,22$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $P<0,05$, día 18). Había una significativa pérdida de peso corporal en ratones portadores de tumor tratados con vehículo en comparación con ratones no portadores de tumor de edad coincidente ($25,48 \pm 0,35$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $P<0,005$). Por tanto, el tratamiento con anticuerpo de activina A ayudaba a mantener el peso corporal.

Se monitorizó el crecimiento tumoral con medida con calibres digitales y se calculó el tamaño tumoral con la ecuación: $\text{dimensión tumoral (mm}^3\text{)} = L \text{ (mm)} \times W \text{ (mm)} \times W \text{ (mm)} \times 0,5$. El tamaño tumoral no era diferente entre los dos grupos tratado con anticuerpo A1 y tratado con vehículo.

Después de la inoculación de células tumorales C-26, los ratones del grupo tratado con vehículo tenían una pérdida de peso drástica en comparación con los ratones no portadores de tumor ($25,48 \pm 0,35$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $p<0,01$). Sin embargo, el tratamiento con A-1 atenuaba la pérdida media de peso ($19,66 \pm 0,22$ g frente a $18,11 \pm 0,19$ g, $P<0,05$).

El tratamiento con A-1 daba como resultado una conservación significativa de la masa muscular esquelética. Los ratones tratados con A-1 tenían un mayor peso de masa de músculo gastrocnemio ($0,099 \pm 0,002$ g frente a $0,093 \pm 0,001$, $p<0,05$) que en el grupo tratado con vehículo C26.

Al final del experimento, se efectuó la disección del tejido terminal. Los ratones portadores de tumor C-26 de control tenían un peso magro en la canal significativamente menor ($6,75 \pm 0,11$ g) que el de los ratones tratados con anticuerpo A1 ($7,20 \pm 0,16$ g, $p<0,05$ frente a C-26 + grupo de vehículo).

La masa corporal magra se perdía notablemente en el grupo tratado con vehículo C-26 ($-1,85 \pm 0,24$ g en comparación con su masa corporal magra inicial). El tratamiento con A-1 en ratones portadores de tumor C-26 atenuaba significativamente la pérdida de masa corporal magra ($-0,60 \pm 0,26$ g, $p<0,05$ frente a C26-grupo de vehículo).

El tratamiento con anticuerpo monoclonal A1 anti-activina A es eficaz en la atenuación de la pérdida de peso corporal total inducida por la caquexia por cáncer. El efecto protector del anticuerpo A1 está asociado a la conservación de la masa muscular esquelética, la masa magra de la canal y la masa corporal magra total en un modelo animal de caquexia por cáncer de mûrido bien establecido.

El presente estudio proporciona evidencias preclínicas de que la neutralización de activina A usando anticuerpo monoclonal A1 atenuaba significativamente la pérdida de peso corporal y conservaba el músculo esquelético y la masa corporal magra.

EJEMPLO 13**ELISA DE ACTIVINA A**

Los anticuerpos de activina A pueden usarse para ensayar y cuantificar la activina A en muestras, tales como muestras biológicas. Se adquirieron la activina A recombinante humana (100 ng/ml, nº de cat. 10-85106) y tampón de dilución de ensayo (0 mg/ml, nº de cat. 10-85101) en DSLabs (Webster, Texas) y se almacenaron a 4 °C. Se prepararon los patrones recientes antes del experimento por dilución en tampón de ensayo.

Se obtuvieron los sueros humanos de Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY). Se hicieron alícuotas de los sueros para la medida de activina A a 110 µl para minimizar la variación debida a la congelación-descongelación. Se diluyeron las muestras 1/3 con tampón de ensayo y se midieron en ELISA.

Se efectúa el ELISA de activina A (ELISA de una etapa) usando las siguientes etapas:

Se recubrieron placas de 96 pocillos Corning Costar 3590 con 100 µl de AcM anti-activina A 4 µg/ml (A2) durante una noche a temperatura ambiente con agitación suave a 500-600 rpm. Se lavaron los pocillos (400 µl/pocillo) tres veces con PBS que contenía un 0,02% (v/v) de Tween 20. Se bloquearon los pocillos con 300 µl de tampón de bloqueo I durante 2 horas a temperatura ambiente y se retiró entonces el tampón de bloqueo.

Se añadieron 100 µl de patrón de activina A/ o 100 µl de muestras diluidas, y se añadieron 25 µl de AcM anti-activina A 0,5 µg/ml. marcado con HRP (A1/HRP) en tampón de ensayo. Para las medidas de activina A libre, se diluyeron los sueros 1/3 en tampón de ensayo. Para las medidas de activina A total, (1) se acidificaron los sueros (pH 4-5) con HCl al 20 % (2 µl por 110 µl de sueros), (2) se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, (3) se neutralizaron añadiendo 2 µl de NaOH 5 N (2 µl por 110 µl de sueros) y (4) se diluyeron 1/3 en tampón de ensayo.

Se llevó a cabo la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 600-700 rpm. Se lavaron los pocillos (400 µl/pocillo) tres veces con PBS que contenía un 0,02% (v/v) de Tween-20. Se añadieron 100 µl de TMB (R&D System, Minneapolis, MN), seguido de incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de disolución de parada (R&D System, Minneapolis, MN). Se efectuó la medida de DO usando 450 nm en el SpectraMax M5 de Molecular Device.

Se generó una curva patrón representando la absorbancia a 450 nm frente al logaritmo de la concentración de activina rh usando un programa de ajuste de curva log-log (o logística de cinco parámetros) de Molecular Device. Se obtuvieron los valores de concentraciones de muestra por interpolación de su absorbancia a partir del patrón.

El anticuerpo de captura era el AcM anti-activina A A-3, 20,78 mg/ml. El anticuerpo de detección era AcM anti-activina A A-1 con HRP , 0,65 HRP/Ab, 12,05 mg/ml. El tampón de bloqueo era tampón de bloqueo I. El tampón de lavado era PBS/Tween al 0,1 %. El tampón de ensayo (diluyente reactivo) era tampón de activina A 0 mg/ml.

EJEMPLO 14**ANÁLISIS DE PROTECCIÓN DE PROTEASAS DE ACTIVINA A**

Se realizaron ensayos de protección de proteasas para identificar la unión epitópica de los anticuerpos de activina A. Se analizó la preparación degradada de activina A humana recombinante mediante tres métodos. El primer método examinaba una preparación de activina A que se había degradado durante la purificación. El segundo método incluía la proteólisis de la preparación de activina A con lisina C, quimotripsina, pepsina y termolisina. El tercer método incluía la degradación química de la preparación usando bromuro de cianógeno.

Por tanto, para la proteólisis de complejo de activina humana y anticuerpo, se mezclaron 5 microgramos de activina A y 90 microgramos de anticuerpo en 100 microlitros de bicarbonato de amonio 0,1 M (pH 7,8) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos antes del tratamiento con 2 % en peso de la proteasa seleccionada particular. Se permitió la digestión de la proteína a 37 °C durante 90 minutos. Se llevaron a cabo muestras de control que contenían activina A sola o anticuerpo solo de idéntico modo. Se acidificaron las muestras antes del análisis de HPLC-FI.

Para la digestión con bromuro de cianógeno de la activina A, se generaron con CNBr fragmentos de activina A incubando 10 microgramos de la proteína con CNBr en 100 microlitros de TFA al 90 % durante una noche a temperatura ambiente. Se mantuvo la muestra en la oscuridad a lo largo de la incubación y se secó a vacío antes del análisis de HPLC-FI.

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

La preparación se había degradado durante la purificación, conteniendo las siguientes especies:

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

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

1. 1GLECDGKVNICKKKQFFVSFKDIGWNDWII³⁰
2. 31APSGYHANYCEGECPSHIAGTSGSSLSFH↓S₆₀
3. 61TVINHYRMRGHSPFANLKSCCVPTKLRPMS₉₀
4. 91MLYY↓DDGQNIKKDIQNMIVEECGCS₁₁₆

Las especies enunciadas en la Figura 9 indican las localizaciones de los sitios de escisión cuando se degradaba la preparación de activina A por quimotripsina, lisina C (LysC) o bromuro de cianógeno (CNBr).

EJEMPLO 15

ENSAYO DE UNIÓN A ACTIVINA A

- 15 Los anticuerpos monoclonales A1, A2 y A3 se unen a la activina A pero no a la activina B, según las afinidades de unión enumeradas en la Tabla 6. Por tanto, se efectuó un análisis de afinidad de los anticuerpos de activina A A1, A2 y A3 para determinar la región o estructura necesaria para la unión del anticuerpo neutralizante. Son conocidas diversas proteínas de unión a activina A, incluyendo ActRII (AB), ActRI (A/B)(Alt4), folistatina y gen relacionado con folistatina (FLRG).
- 20 Se realizaron ensayos de unión para cribar anticuerpos para valorar su capacidad de unirse a superficies de anticuerpos inmovilizados (activina A y/o activina B). Se efectuaron los ensayos de unión utilizando activina A rh 2 nM y 20 nM de cada anticuerpo inmovilizado sobre una superficie. Se inmovilizaron los siguientes anticuerpos sobre una superficie y se ensayaron: AKA1 (comercialmente disponible), AKA2 (comercialmente disponible), A1 y A3. Se indican los resultados del ensayo de anticuerpo en la Figura 10.

Ac anti-activina A	A2	A3	A1	AKA1	AKA2
Activina A	K _D ~ 25 pM	K _D ~ 11 pM	K _D ~ 3 pM	K _D ~ 4 pM	K _D ~ 4 pM
Activina B	-----	-----	-----	-----	-----

EJEMPLO 16

CARTOGRAFÍA DE LA REGIÓN DE ENSAYO DE UNIÓN A ACTIVINA A (BIACORE)

- Se realizaron ensayos de bloqueo en superficies químicas de RIB de activina humana-Fc recombinante, superficies químicas de RIIB de activina humana-Fc recombinante y superficies recombinantes químicas de RIIA-Fc humana recombinante como se describe en el Ejemplo 5. Se incubaron los anticuerpos monoclonales A1, A2, AKA1 y AKA2 en cada superficie química con activina A 1 nM, y se midió la respuesta de unión relativa (%). Una respuesta de unión aumentada en presencia de anticuerpos indica que la activina A es capaz de unirse a las superficies de receptor inmovilizado y a los anticuerpos en disolución simultáneamente, a lo que se hace referencia como "continuar". Se indican los resultados en la Tabla 7 y la Figura 11, en que CE50 significa la concentración eficaz que procura un 50 % de unión.

Tabla 7

CE50 (nM)	Quimera de RIB de activina rh/Fc	Quimera de RIIB de activina rh/Fc	Quimera de FIIA de activina rh/Fc
AKA1	Bloqueo parcial	0,30	0,35
AKA2	Bloqueo parcial	0,36	0,37

CE50 (nM)	Quimera de RIB de activina rh/Fc	Quimera de RIIB de activina rh/Fc	Quimera de FIIA de activina rh/Fc
A1	0,29	0,29	0,29
A2	0,18	Continuar	Continuar

EJEMPLO 17**QUIMERAS DE ACTIVINA A/B**

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

Brevemente, se usó un clon de activina A completa como molde para amplificación por PCR usando polimerasa Pfu ultra (Stratagene) y cebadores (SEQ ID NO: 245 y SEQ ID NO: 246) al inicio de la secuencia de proteína madura. Se purificó en columna (Qiagen) el producto de PCR resultante, se digirió con las enzimas de restricción Sall y XbaI (Roche) y se aisló en gel (Qiagen). Se diseñaron módulos génicos sintéticos que contienen las secuencias de proteína madura modificada utilizando las secuencias aminoacídicas de la activina A y activina B completas y retrotraduciendo a secuencias de ADN de codón optimizado para expresión en una célula hospedadora de mamífero usando el programa Gene Designer (versión 1.0.4, DNA 2.0, Inc.) (BMC Bioinformatics, 7: 285 (2006)). Se digirieron las secuencias con XbaI y NotI y se aislaron en gel. Se ligó el producto de PCR de activina A en condiciones de reacción estándares usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs, Inc.) con el fragmento génico sintético 13-39 (SEQ ID NO: 247) o el fragmento génico sintético 82-107 (SEQ ID NO: 213) y un vector de expresión digerido con Sall/NotI (pDRSalpha 24), produciendo constructos de expresión completos. El constructo génico sintético de activina A con los aminoácidos 13-39 reemplazados por la secuencia de activina B (SEQ ID NO: 247) y el constructo génico sintético de activina A con los aminoácidos 82-107 reemplazados por la secuencia de activina B (SEQ ID NO: 248) se utilizaron entonces en experimentos de cartografía epitópica (resultados mostrados en la Figura 12).

A partir de lo anterior, aunque se han descrito en la presente memoria realizaciones específicas de la invención con fines de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención como se presenta en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amgen Inc.

<120> ANTICUERPOS ANTI-ACTIVINA A Y USOS DE LOS MISMOS

<130> FB21339/A

<150> 60/843.430

<151> 08-09-2006

<150> 60/956.653

<151> 17-08-2007

<160> 247

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 596 184 T3

tcctatgagg tgactcaggc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttggt ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg aaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318

<210> 2

<211> 366

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agttatggc tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcatccctt acaatggtaa cacaaactct 180
gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagacagg 300
gactacggtg tcaattatga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 3

<211> 33

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

tctggagata aattggggga taaatatgct tgt 33

<210> 4

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

caagatagca agcggccctc a 21

20 <210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

25 caggcgtggg acagcagcac tgcggta 27

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 6

ggttacacct ttaccagta tggctcagc 30

<210> 7

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 7

tgatcatcc cttacaatgg taacacaaac tctgcacaga aactccaggg c 51

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

<400> 8

gacagggact acggtgtcaa ttatgatgct ttgatatc 39

<210> 9

<211> 106

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10

20

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

ES 2 596 184 T3

```

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

```

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1              5

```

<210> 13

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 1              5

```

20 <210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 15

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 16
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5
<210> 17
<211> 321
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 17
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
<210> 18
15 <211> 373
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 18
caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300
aactggaact acgacaacta ctactacggt ctggacgtct gggggccaagg gaccacggctc 360
accgtctcct cag 373
20 <210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 19
25 cgggcaagtc agggcattag aaataattta ggc 33
<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
30 <400> 20

gctgcatcca gtttgcaaag t 21
 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 ctacagcata atagttaccc gtggacg 27
 <210> 22
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ggattcacct tcagtagtta cggcatgcac 30
 <210> 23
 15 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 gttatatggt atgatggaag taataaatac catgcagact ccgtgaaggg c 51
 20 <210> 24
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 25 agtcggaact ggaactacga caactactac tacggtctgg acgtc 45
 <210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 25

ES 2 596 184 T3

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

<210> 26

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

20 <210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 29
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 30
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5 10
 10 <210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 32
 Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 321
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcgacag caaaatactt acccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321
 <210> 34
 <211> 369
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

ES 2 596 184 T3

```

gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggagggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agttattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg cgtggccaac ataaagcaag atggaagtga ggaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggtagc 300
agcagctggg actactacaa ctacggtatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

```

<210> 35

<211> 33

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 35

cgggcaagtc agggcattag aaatgattta ggc 33

<210> 36

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 36

gctgcatcca gtttcaaag t 21

<210> 37

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37

cgacagcaaa atacttacc gctcact 27

20 <210> 38

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 38

25 ggattcacct ttagtagtta ttgatgagc 30

<210> 39

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 39

aacataaagc aagatggaag tgaggaatac tatgtggact ctgtgaaggg c 51

<210> 40

<211> 42

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40

ggtagcagca gctggtacta ctacaactac ggtatggacg tc 42

5

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

10

<210> 42

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

20

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 44
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 Arg Gln Gln Asn Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 46
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5 10
 <210> 47
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
 30 1 5 10
 <210> 49
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 596 184 T3

<400> 49

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtactg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc ttttcggggc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt gggtcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct ccaaactccg 300
tgcagttttg gccaggggac caagctggag atcaag 336

```

<210> 50

<211> 363

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

```

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

```

<210> 51

10

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 51

aggctctagtc agagcctcct gcatagtact ggatacaact atttggat 48

15

<210> 52

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

20

ttgggtctt ttcgggcctc c 21

<210> 53

<211> 26

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 53

atgcaagctc tccaaactcc gtgcag 26

<210> 54

<211> 30

<212> ADN

30

<213> Homo sapiens

<400> 54

ggatacacct tcaccggcta ctatatccac 30

<210> 55

<211> 51

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 55

tggatcaacc ctaacagtgg tggcacaaac tatgcacaga agtttcaggg c 51

<210> 56

<211> 36

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 56

gattcgggggt atagcagcag ctggcacttt gactac 36

<210> 57

15 <211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 58

ES 2 596 184 T3

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

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 61

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val

20 1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 62

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

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

5 <210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

<210> 65

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 65

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

<210> 66

<211> 488

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 66

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcaat agtttctact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaat 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaccca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agacagtata 300
gcagccccc ttgactactg gggccaggga accctgggtc ccgtctcctc agcttccacc 360
aaggggcccat ccgtcttccc cctggcgcgc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 488
tgcgcct

<210> 67

<211> 51

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 67

aagtcagcc agagtatatt atacagttcc aacaataaga agtatctagt t 51

<210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 68
 tggacatcta tgcggaatc c 21
 <210> 69
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 cagcaatatt atagtactcc gtggacg 27
 <210> 70
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 ggtggctcca tcaatagttt ctactggagc 30
 <210> 71
 20 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 tatatctatt acagtgggag caccaactac aatccctccc tcaagagt 48
 25 <210> 72
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 30 gacagtatag cagccccctt tgactac 27
 <210> 73
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 73

ES 2 596 184 T3

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

<210> 74

<211> 117

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

<210> 75

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

15

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

20

Trp Thr Ser Met Arg Glu Ser
 1 5

<210> 77

ES 2 596 184 T3

```

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 77
      Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
        1             5
5
<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 78
      Gly Gly Ser Ile Asn Ser Phe Tyr Trp Ser
        1             5             10
10
<210> 79
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 79
      Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
        1             5             10             15
15
<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 80
      Asp Ser Ile Ala Ala Pro Phe Asp Tyr
        1             5
20
<210> 81
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 81
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaggcattagc aactatttaa attggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg taagttacta ctgtcaacag agttacagta tttcgccac tttcggcggc 300
gggaccaagg tggagaacaa a
321
30
<210> 82
<211> 357
<212> ADN

```

<213> Homo sapiens

<400> 82

```
cagggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcgagagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gcttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaggcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag agtacagtgg 300
ctcgaactgg cctactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357
```

<210> 83

5

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 83

```
cgggcaagtc agagcattag caactattta aat 33
```

10

<210> 84

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

15

<210> 85

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<400> 85

```
caacagagtt acagtatttc gccact 27
```

<210> 86

<211> 30

<212> ADN

25

<213> Homo sapiens

<400> 86

```
ggtgggtcct tcagtgccta ctactggagc 30
```

<210> 87
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 87
 gaaatcaatc atagtggagg caccaactac aaccgtccc tcaagagt 48
 <210> 88
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 gtacagtggc tcgaactggc ctacttgac tac 33
 <210> 89
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Ser Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Asn Lys
 100 105
 20 <210> 90
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90

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

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 91

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

<210> 92

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 93

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Thr
 1 5

20 <210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

5 <210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

10 <210> 97

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 97

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaggcca gggcattaga aatgatttag tctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagatcttg caacttatta ctgtctacaa cataaacttt acccattcac ttctggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a                                     321
  
```

<210> 98

<211> 363

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 98

```

cagggtgcagc tgggtggactc tgggggaggg gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcatt agctatggca tgcactgggt ccgccagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atctgggtatg atggaagtac tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
cagtggctct accactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca                                     363
  
```

<210> 99

<211> 33

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 99

cgggcagggtc agggcattag aaatgattta gtc 33

<210> 100

30 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

```

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

```

5 <210> 101

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 101

10 ctacaacata atacttacc attcact 27

<210> 102

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 102

ggattcacct tcattagcta tggcatgcac 30

<210> 103

<211> 51

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 103

gttatctggt atgatggaag tactgaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 104

<211> 36

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 104

gagaggcagt ggctctacca ctacggtatg gacgtc 36

<210> 105

30 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

```

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

```

5

<210> 106

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

```

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

```

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

```

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

```

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

10

15

20

ES 2 596 184 T3

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

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 109

Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 110

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

<210> 111

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

20 <210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

25 Glu Arg Gln Trp Leu Tyr His Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 113

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

<210> 114

5

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

10

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15

<221> VARIANTE

<222> 1

<223> Xaa = Arg o Lys

<220>

<221> VARIANTE

20

<222> 6

<223> Xaa = Leu o Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

25

<223> Xaa = His o Tyr

<220>

<221> VARIANTE

<222> 10

<223> Xaa = Thr o Ser

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> 11
 <223> Xaa = Gly o Asn
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> 12
 <223> Xaa = Tyr o Asn
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 10 <223> Xaa = Asn o Lys
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Lys o -Xaa (Xaa borrado)
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)...(17)
 <223> Xaa = Asp o Val
 <400> 115

Xaa	Ser	Ser	Gln	Ser	Xaa	Leu	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Leu
1				5					10					15	

 20 Xaa
 <210> 116
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Ser o Gly
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Ser o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> 7
 <223> Xaa = Ser o Arg

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr o Asp o Asn
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Asp o Val o Gly
 <400> 116
 10 **Arg Ala Xaa Gln Xaa Ile Xaa Asn Xaa Leu Xaa**
 1 5 10
 <210> 117
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 117
 cagcaatatt atagtactcc gtggacg 27
 <210> 118
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 118
 ggtggctcca tcaatagttt ctactggagc 30
 <210> 119
 <211> 48
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 119
 tatatctatt acagtgggag caccaactac aatccctccc tcaagagg 48
 <210> 120
 30 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 120
 gacagtatag cagccccctt tgactac 27
 35 <210> 121
 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

```

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

```

5

<210> 122

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

```

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

```

10

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Glu o Asp

<220>

20

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Trp o Leu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Glu o Asp
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr o Phe
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa = Ala o Val
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> 11
 <223> Xaa = Cys o Phe
 <400> 123
 Ser Gly Xaa Lys Xaa Gly Xaa Lys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 124
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> 1
 <223> Xaa = Ala o Trp o Leu
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 30 <223> Xaa = Thr o Ala o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Ser o Met o Phe
 35 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 5
 <223> Xaa = Leu o Arg
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> 6
 <223> Xaa = Gln o Glu o Ala
 <400> 124
 Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Ser
 1 5
 <210> 125
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 15 1 5
 <210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 126
 Gly Gly Ser Ile Asn Ser Phe Tyr Trp Ser
 1 5 10
 <210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 127
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg
 1 5 10 15
 <210> 128
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 35 <223> Xaa = Gln o Leu o His

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Thr o Asn o Ser

5 <400> 128

Xaa Asp Xaa Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 129

<211> 321

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 129

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 130

<211> 372

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 130

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcaactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300

aactgggaact acgacaacta ctactacgggt ctggacgtct gggggccaagg gaccacgggtc 360

accgtctcct ca 372

20 <210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Thr o Ser

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> 7

<223> Xaa = Pro o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Phe o Trp
 5 <400> 131
 Leu Gln His Asn Xaa Tyr Xaa Xaa Thr
 1 5
 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Met o Gln o Arg
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Ala o Tyr o Gln o Ser
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Leu o Tyr o Asn
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> 5
 <223> Xaa = Gln o Ser o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 30 <223> Xaa = Thr o Tyr o Ile
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Pro o Ser
 35 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Cys o Trp o Leu o Pro
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (9) ... (9)
 <223> Xaa = Ser o Thr
 <400> 132
 Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 133
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 133
 ctacagcata atagtaccc gtggacg 27
 15 <210> 134
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Ile o Phe
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> 5
 <223> Xaa = Asn o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 30 <223> Xaa = Ser o Ala
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Gly o -Xaa (Xaa borrado)
 35 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 8
 <223> Xaa = Gly o -Xaa (Xaa borrado)
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> 9
 <223> Xaa = Phe o Tyr
 <400> 134
 Gly Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 135
 10 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 135
 gttatatggt atgatggaag taataaatac catgcagact ccgtgaaggg c 51
 15 <210> 136
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 136
 20 agtcggaact ggaactacga caactactac tacggtctgg acgtc 45
 <210> 137
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 137
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 138
 <211> 124
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 138

```

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

```

<210> 139

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

10 <223> Xaa = Tyr o Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Tyr o Ser

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Thr o Ser o Ile

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> 6

<223> Xaa = Gly o Ser

<220>

<221> VARIANTE

25 <222> 8

<223> Xaa = Tyr o Gly o Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Ile o Met
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 5 <223> Xaa = His o Gly
 <400> 139
 Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 140
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 15 <223> Xaa = Tyr o Phe
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Thr o Ser
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Ser o Ala
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Gly o Trp
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> 9
 <223> Xaa = Leu o Met o Ile
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 35 <223> Xaa = Ser o His
 <400> 140

	Gly	Xaa	Thr	Phe	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa
	1				5					10

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 141

	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Trp	Thr
	1				5				

<210> 142

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

15 <223> Xaa = Tyr o Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Ser o Tyr o Asn

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Tyr o His

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> 7

<223> Xaa = Ser o Gly

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> 9

<223> Xaa = Tyr o Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> 16

35 <223> Xaa = Ser o Arg

<400> 142

ES 2 596 184 T3

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Xaa
 1 5 10 15
 <210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 143
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 144
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144
 Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 145
 15 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 145
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagaaaaatg gggagagaaa tatgcttggt ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat accaagcggc cctccgggat ccctgagcga 180
 ttctctgggt ccatttctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggetg actattattg tcaggcgtgg gacaggagca ctgtattcgg cggaggggacc 300
 aagctgaccg tccta 315
 20 <210> 146
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 146
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtcagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaagga 300
 25 ctgggggttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348
 <210> 147
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 147
 tctggagaaa aatggggaga gaaatatgct tgt 33
 <210> 148
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 148
 caagatacca agcggccctc c 21
 <210> 149
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 149
 caggcgtggg acaggagcac tgta 24
 15 <210> 150
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 150
 20 ggatacagct ttaccagcta ctggatcggc 30
 <210> 151
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 151
 atcatctatc ctggtgactc tgataccaga tacagcccgt cctccaagg c 51
 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 152
 caaggactgg ggtttgacta c 21
 <210> 153
 <211> 105
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 153

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

<210> 154

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 154

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

<210> 155

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

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

<210> 156

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

20 <210> 157

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 157
 Gln Ala Trp Asp Arg Ser Thr Val
 1 5
 <210> 158
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 158
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5 10
 10 <210> 159
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 159
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 160
 Gln Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 161
 <211> 318
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgctttct ggtatcagct gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgcggctg acttttactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtgtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318
 <210> 162
 <211> 363
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 162

ES 2 596 184 T3

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt ggttacatct cttacagtgg gagcacctac 180
tacaaccctg ccctcaagag tgcagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgcgcgct 300
tacgggtgact atcgcgggctg gttcgacccc tggggccagc gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 163

<211> 33

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 163

tctggagata aattggggga taaattgct ttc 33

<210> 164

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 164

caagataaca agcggccctc a 21

<210> 165

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 165

caggcgtggg acagcagcac tgtgta 27

20 <210> 166

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 166

25 ggtggctcca tcagcagtg tggttactac tggagc 36

<210> 167

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 167

tacatctctt acagtgggag cacctactac aaccgtccc tcaagagt 48

<210> 168

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 168

gcttacggtg actatcgcg cgtggtcgac ccc 33

<210> 169

5 <211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

```

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

```

10 <210> 170

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

```

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

```

15 <210> 171

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 171

```

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

```

<210> 172
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 172
 Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 1 5
 <210> 174
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 174
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5 10
 <210> 175
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 175
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 176
 30 Ala Tyr Gly Asp Tyr Arg Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10
 <210> 177
 <211> 321
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

<400> 177

```
gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattgtg caacttatta ttgtctacag cataatagtt atacgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
```

<210> 178

<211> 372

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 178

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt gcctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcatcatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggtctgtg attactgtgc gagaagtcgg 300
aactgggaact acgactccta ccaatacgggt ttggacgtct gggggccaagg gaccacgggtc 360
accgtctcct ca 372
```

<210> 179

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

15

<222> 1

<223> Xaa = Asn o Val

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

20

<223> Xaa = Trp o Lys

<220>

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Tyr o Gln

25

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = Asn o Glu o Ser

<220>

30

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Lys o Glu
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 5 <223> Xaa = His o Tyr
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Ala o Val
 10 <400> 179

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Asp	Gly	Ser	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

 <210> 180
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Trp o Ile
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Asn o Ile o Ser o Tyr
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Pro o Ala
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> 5
 <223> Xaa = Asn o Tyr o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 35 <223> Xaa = Ser o Asn o Asp
 <220>

<221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Gly o Ser
 <220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Gly o Asn o Asp
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Asn o Arg
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 15 <223> Xaa = Tyr o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Ala o Ser
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Gln o Pro
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Lys o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Phe o Leu
 <400> 180
 Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 181
 35 <211> 27
 <212> ADN

ES 2 596 184 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 181
 ctacagcata atagttatac gtggacg 27
 <210> 182
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 182
 ggattcacct tcagtccta tggcatgcac 30
 10 <210> 183
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 183
 15 gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51
 <210> 184
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 184
 agtcggaact ggaactacga ctctaccaa tacggtttgg acgtc 45
 <210> 185
 <211> 107
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Cys Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Thr Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 186
 <211> 124
 30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

```

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

```

<210> 187

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 1

<223> Xaa = Val o -Xaa (Xaa borrado)

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

15 <223> Xaa = Gln o -Xaa (Xaa borrado)

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Asp o Trp o -Xaa (Xaa borrado)

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Ser o Leu o -Xaa (Xaa borrado)

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Ile o Glu o Gln

<220>

<221> VARIANTE

	<222> 6																								
	<223> Xaa = Ala o Leu o Gly																								
	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
5	<222> (7)...(7)																								
	<223> Xaa = Ala o Leu																								
	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
	<222> (8)...(8)																								
10	<223> Xaa = Pro o Tyr o Gly																								
	<400> 187																								
	<table><tr><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Xaa</td><td>Phe</td><td>Asp</td><td>Tyr</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td></tr></table>	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Asp	Tyr	1				5						10	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Asp	Tyr														
1				5						10															
	<210> 188																								
	<211> 13																								
15	<212> PRT																								
	<213> Homo sapiens																								
	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
	<222> 1																								
20	<223> Xaa = Asp o -Xaa (Xaa borrado)																								
	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
	<222> 2																								
	<223> Xaa = Gln o -Xaa (Xaa borrado)																								
25	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
	<222> 3																								
	<223> Xaa = Asp o Ala																								
	<220>																								
30	<221> VARIANTE																								
	<222> 5																								
	<223> Xaa = Tyr o Gly																								
	<220>																								
	<221> VARIANTE																								
35	<222> 7																								
	<223> Xaa = Ser o Tyr																								

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Ser o Arg
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Phe o -Xaa (Xaa borrado)
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Gly o Asp
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = His o Pro
 <400> 188
 Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 189
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Thr Trp Thr
 1 5
 25 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 190
 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Gly Met His
 30 1 5 10
 <210> 191
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 191

ES 2 596 184 T3

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 192
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 192
Ser Arg Asn Trp Asn Tyr Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10 15
<210> 193
<211> 315
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 193
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgtttgtt ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg aactgggtcat ctatctagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggetg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca cggtattcgg cggaggggacc 300
aaactgaccg tcctg 315
<210> 194
15 <211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 194
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagag gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca catcaacgac cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
gattactatg atagtagtgg ttggggccac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363
20 <210> 195
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 195
25 tctggagata aattggggga taaatatgtt tgt 33
<210> 196
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 196
 ctagataaca agcgccctc a 21
 <210> 197
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 197
 caggcgtggg acagcagcac ggta 24
 <210> 198
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 gggtacacct ttaccagcta tggatcagc 30
 15 <210> 199
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 20 tggatcagcg cttacaatgg taacacaaac tatgcacaga agttccaggg c 51
 <210> 200
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 200
 gatcaagatt actatgatag tagtggtgg ggccac 36
 <210> 201
 <211> 105
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 201

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

<210> 202

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 202

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

<210> 203

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

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

<210> 204

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Leu Asp Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

20 <210> 205

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 205
 Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val
 1 5
 <210> 206
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 206
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10
 10 <210> 207
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 207
 Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 208
 Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Trp Gly His
 1 5 10
 <210> 209
 <211> 316
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 209
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agcctccatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgctttct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tgctgggtctt ctatcatgat accaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggetg actatcactg tcaggcgtgg gacagcagca cggctcttcgg cggaggggacc 300
 aagctgaccg tcctac 316
 <210> 210
 <211> 363
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 210

ES 2 596 184 T3

```

cagggttcagc tgggtgcaatc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcagccctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgcg atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcaa 300
gattactatg atagtagtgg ttgggacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcg
<210> 211
<211> 33
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<400> 211
tctggagata aattggggga taaatatgct ttc 33
<210> 212
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 212
catgatacca agcggccctc a 21
<210> 213
15 <211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Quimera de activina A/B
20 <400> 213
gggtctagagt gtgatggcaa ggtcaacatc tgctgtaaga aacagttctt tgtcagtttc 60
aaggacatcg gctggaatga ctggatcatt gctccctctg gctatcatgc caactactgc 120
gagggtagtg gcccgagcca tatagcaggc acgtccgggt caagcttgtc cttccactca 180
acagtcatca accactaccg catgcggggc catagcccct ttgccaacct caaatcatgc 240
tgtattccca ccaagctgag caccatgtcc atgttgtact ttgatgatga gtacaacatc 300
gtcaaaaggg acgttccgaa catgatcgtg gaggagtgtg ggtgctcatg agcggccgct 360
<210> 214
<211> 326
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<400> 214
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

```

[illegible]

<210> 215

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

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

ES 2 596 184 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 216

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 216

gatcaagatt actatgatag tagtggttg gacccc 36

<210> 217

<211> 105

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

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

<210> 218

15 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

ES 2 596 184 T3

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

<210> 219

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

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

<210> 220

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

His Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

15 <210> 221

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

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

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 222

<211> 318

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 222

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

<210> 223

10

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 223

ES 2 596 184 T3

```

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

```

<210> 224

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 224

```

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

```

<210> 225

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

```

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

```

15 <210> 226

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

```

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1             5

```

20 <210> 227

<211> 636

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <400> 227

ES 2 596 184 T3

```
tcctatgagg tgactcaggc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcattc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttggt ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg aaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgccccct cggtcactct gttcccggcc 360
tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc aactggtgt gtctcataag tgactttctac 420
ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 480
accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacggcg ccagcagcta tctgagcctg 540
acgcctgagc agtggaaagc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaaggaggc 600
accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 636
```

<210> 228

<211> 1344

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 228

```
cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agttatgggt tcagctgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcatccctt acaatggtaa cacaaactct 180
gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcctgtg atttctgtgc gagagacagg 300
gactacgggt tcaattatga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcacccgtc 360
tcttcagcct ccaccaaggg cccatcgggtc ttccccctgg cgccctgtct caggagcacc 420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaa cccagcaaca ccaagggtga caagacagtt 660
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 720
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccagag tccagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
ttcgtgtgg tcagcgtcct caccgttggt caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgcagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
```

```
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggt aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgaggga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgtggac 1200
tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 1320
agcctctccc tgtctcggg taaa 1344
```

<210> 229

10

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 229

```
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aataatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaatggg ggtcccacat 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttta caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccggca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttggtg gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaa cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
```

15

<210> 230

<211> 1350

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 230

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggtctggagt ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaataccat 180
gcagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaagtcgg 300
aactggaaact acgacaacta ctactacggt ctggacgtct gggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cagcctccac caaggggcca tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 420
agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt cccggaaccg 480
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgctctg accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc 540
ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc 600
ggcaccacaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
acagttgagc gcaaatgttg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga 720
ccgtcagtc tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcacgatctc ccggaccct 780
gaggtcacgt gctggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 840
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac 900
agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
gagtaacaag gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccacgagaa aacctctcc 1020
aaaaccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgcacctc cccggaggag 1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

```

5

<210> 231

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 231

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcgacag caaataactt acccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccacagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

```

<210> 232

<211> 1347

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 232

10

15

```

gaggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agttattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg cgtggccaac ataaagcaag atggaagtga ggaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggtagc 300
agcagctggt actactacaa ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtag 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
accaaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctctg ccccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

```

<210> 233

<211> 212

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 233

```

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

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180          185          190
Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195          200          205
Thr Glu Cys Ser
210

```

<210> 234

10

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

```

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

```

<210> 235

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

ES 2 596 184 T3

```

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

```

<210> 236

<211> 450

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 236

```

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

```

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 237

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

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

ES 2 596 184 T3

```

      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
  130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210

```

<210> 238

<211> 449

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 238

```

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

```

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 239

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 239

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaaag agactacgag 240
aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcaggggc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 240

<211> 978

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 240

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccacagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcct accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaaccctc ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactgggtga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccactctcaa aaccaaaggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatcccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaa 978

<210> 241

15 <211> 978

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 241

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactgggtga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaagg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac 840
ggctcttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tccctgtctc cgggtaaa 978

```

<210> 242

<211> 824

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 242

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactgggtga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaagg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcc 824

```

<210> 243

10

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera de activina A/B

15

<400> 243

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

<210> 244

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera de activina A/B

<400> 244

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

10 <210> 245

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido

<400> 245

ctcgaggctg actagaccac catgcccttg c 31

<210> 246

<211> 28

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 246

ccatcacact ctagaccccg ccgacgcc 28

<210> 247

5

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera de activina A/B

10

<400> 247

```

ggctctagagt gtgatggcaa ggtcaacatc tgctgtaggc aacagttctt tatcgatttc 60
aggctcatcg gctggaatga ctggatcatt gctccactg gctattatgg caactactgc 120
gaggggtgagt gcccgagcca tatagcaggc acgtccgggt caagcttgtc cttccactca 180
acagtcatca accactaccg catgcggggc catagcccct ttgccaacct caaatcatgc 240
tgtgtgccca ccaagctgag acccatgtcc atgttggtact atgatgatgg tcaaaacatc 300
atcaaaaagg acattcagaa catgatcgtg gaggagtggt ggtgctcatg agcggccgct 360
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una región de nudo de cisteína de activina A humana, abarcando dicha región los aminoácidos C11-S33 y los aminoácidos C81-E111 de la secuencia enunciada en la SEQ ID NO:225, e inhibe la unión de activina A humana a receptor de activina A humana.
2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno posee al menos una actividad biológica *in vivo* seleccionada de atenuación de la caquexia, atenuación de la caquexia en ratones portadores de tumor de colon, mejora de la pérdida de peso corporal en ratones portadores de tumor de colon, mejora de la pérdida de peso en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno, mejora de la pérdida de masa muscular en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno, mejora de la pérdida de masa grasa en un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno y mejora de la pérdida de peso corporal en un modelo animal transfectado con AAV-activina A.
3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, que es totalmente humano.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en terapia.
5. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polinucleótido según la reivindicación 5.
7. El vector según la reivindicación 6, que se selecciona del grupo consistente en un plásmido, vector vírico, vector no episómico de mamífero, vector de expresión y vector de expresión recombinante.
8. Una célula hospedadora en que se ha introducido un vector de expresión recombinante según la reivindicación 7.
9. La célula hospedadora según la reivindicación 8, que es una célula procariótica o eucariótica, p.ej. una célula de mamífero, opcionalmente una célula de ovario de hámster chino (CHO).
10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo consistente en un tampón, un antioxidante, un polipéptido de bajo peso molecular, una proteína, un aminoácido, un carbohidrato, un agente quelante, un estabilizador y un excipiente.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en terapia.

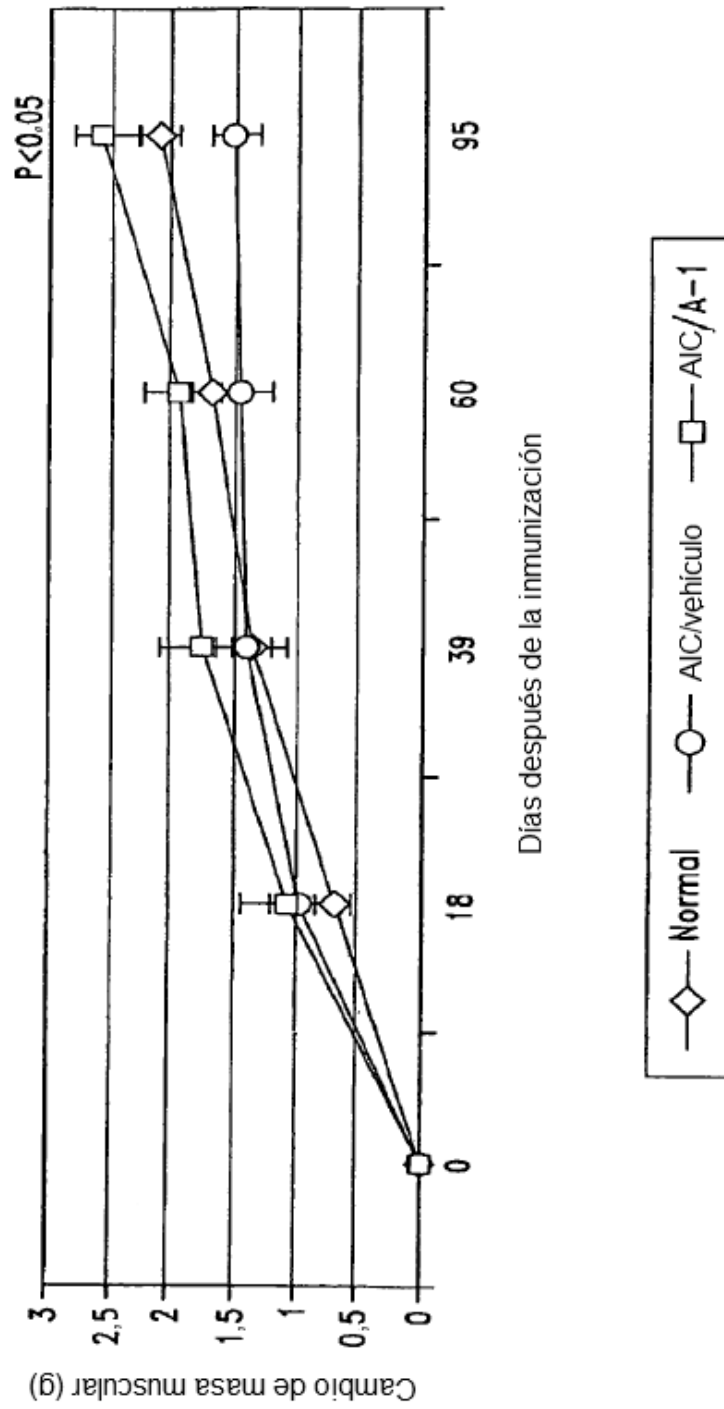


Fig. 1

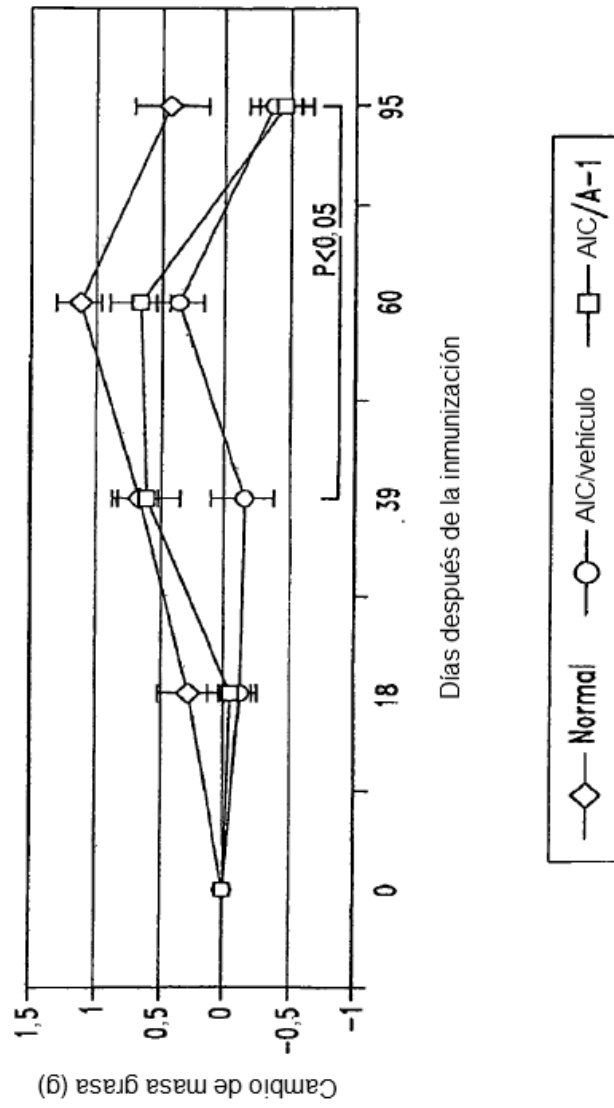


Fig. 2

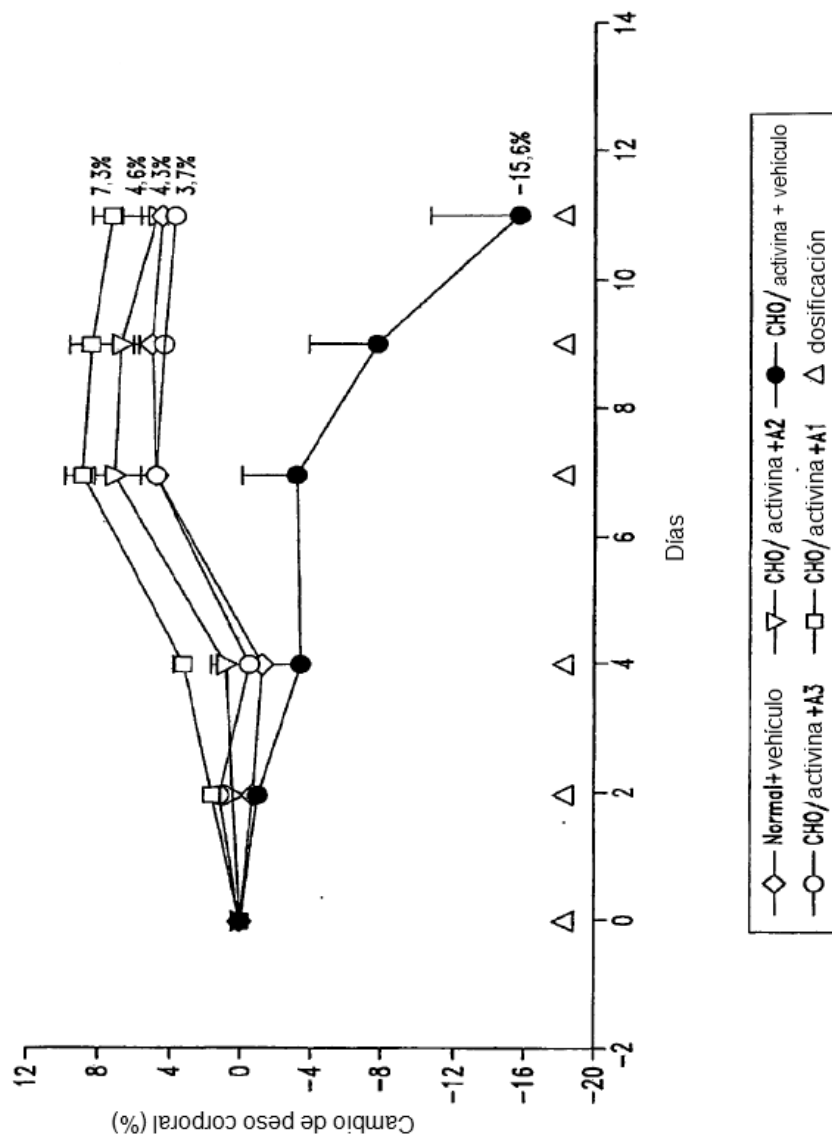


Fig. 3

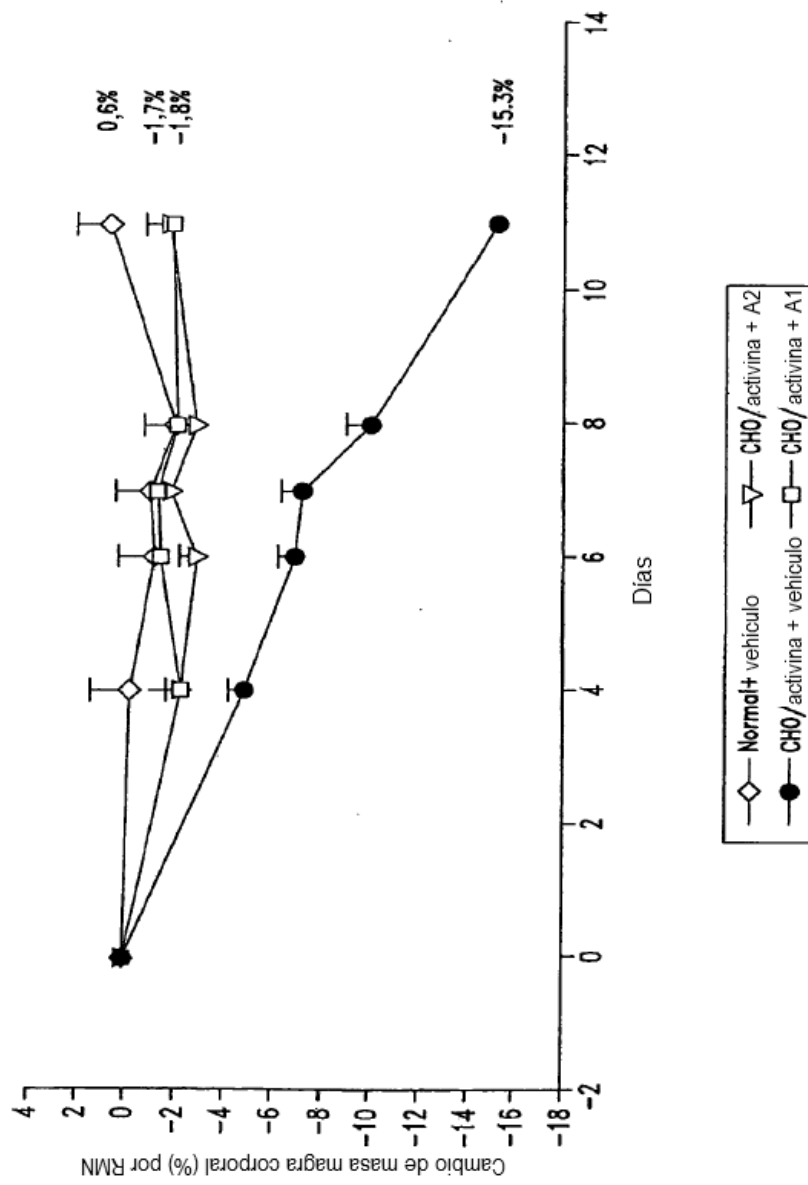


Fig. 4

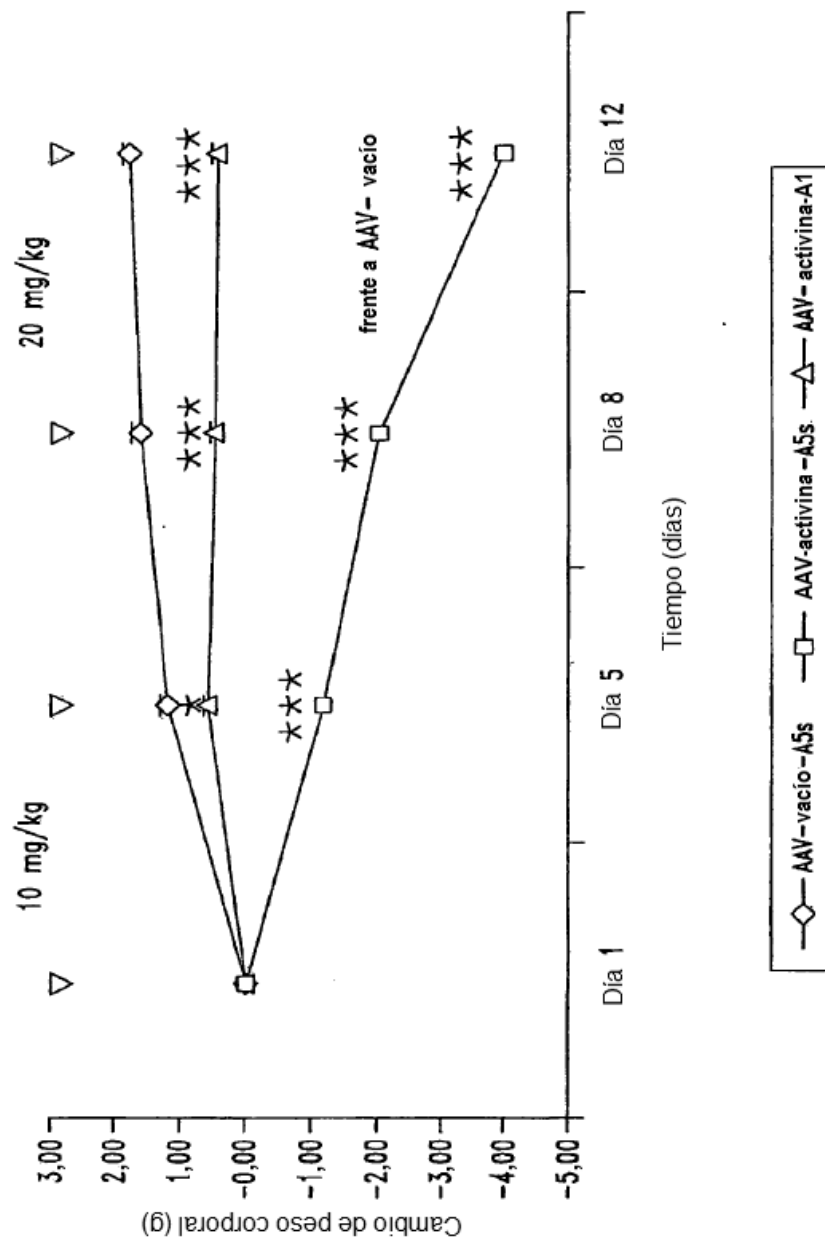


Fig. 5

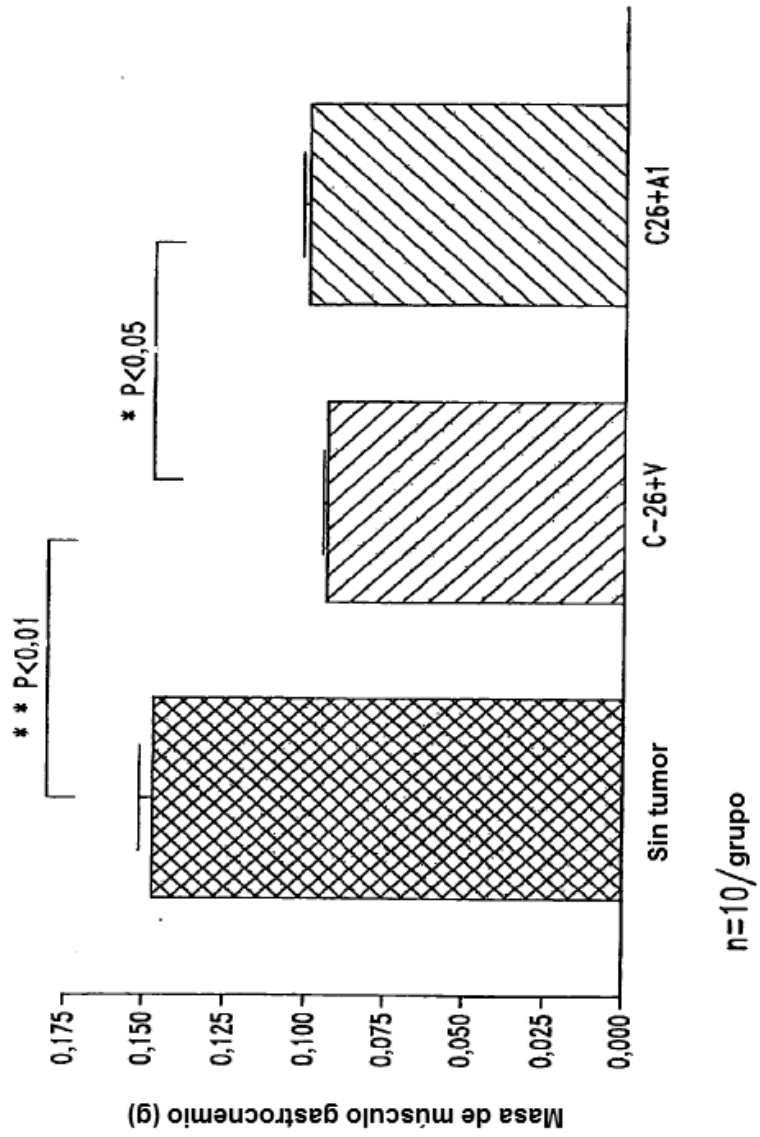


Fig. 6

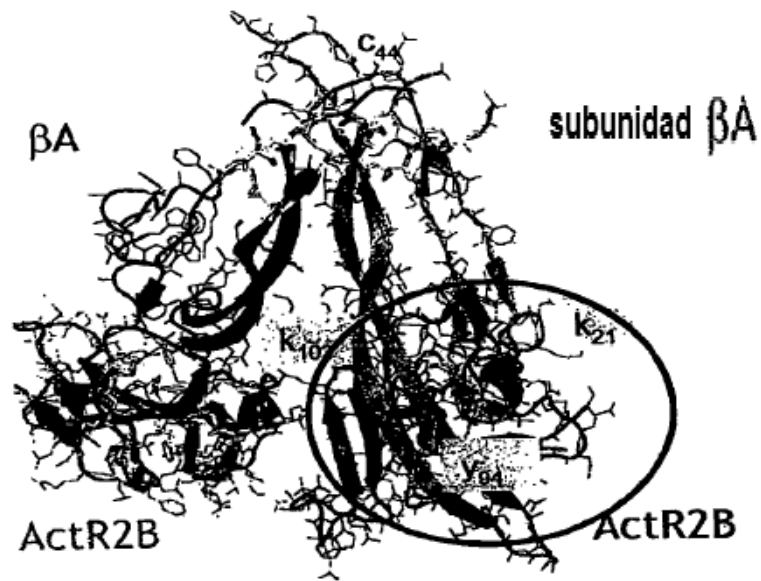


Fig. 7

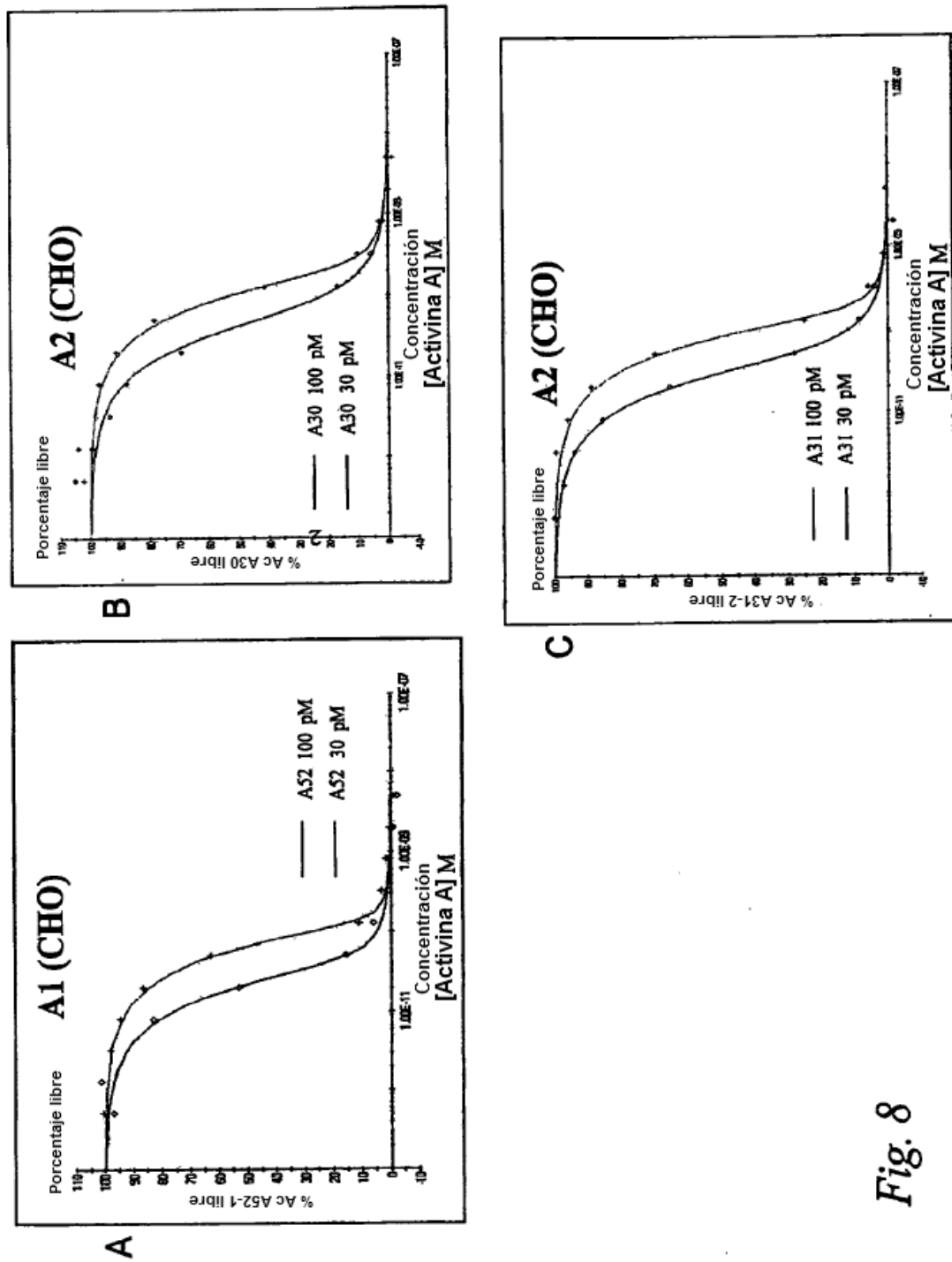
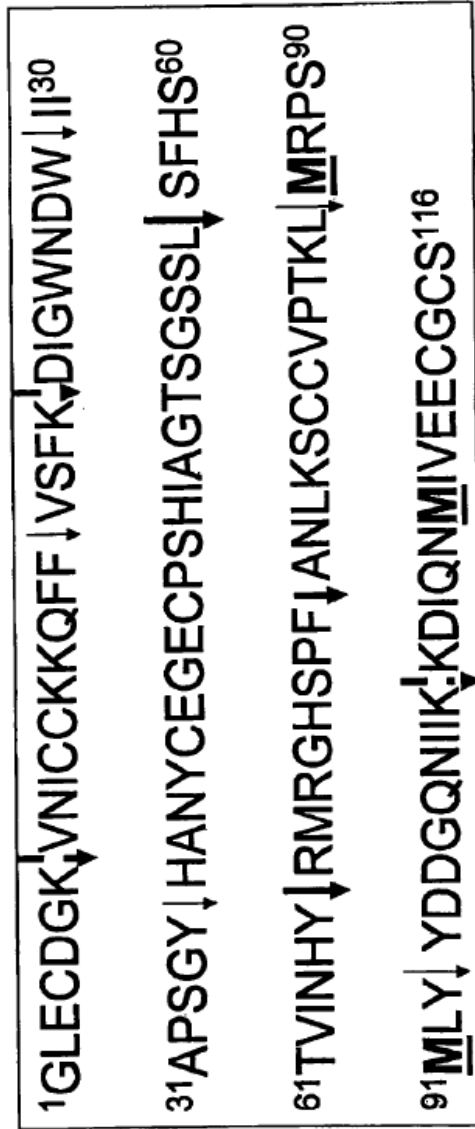


Fig. 8



Flechas continuas- escisión por quimotripsina

Flechas discontinuas- escisión por LysC

M – presunta escisión por CNBr

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

Fig. 9

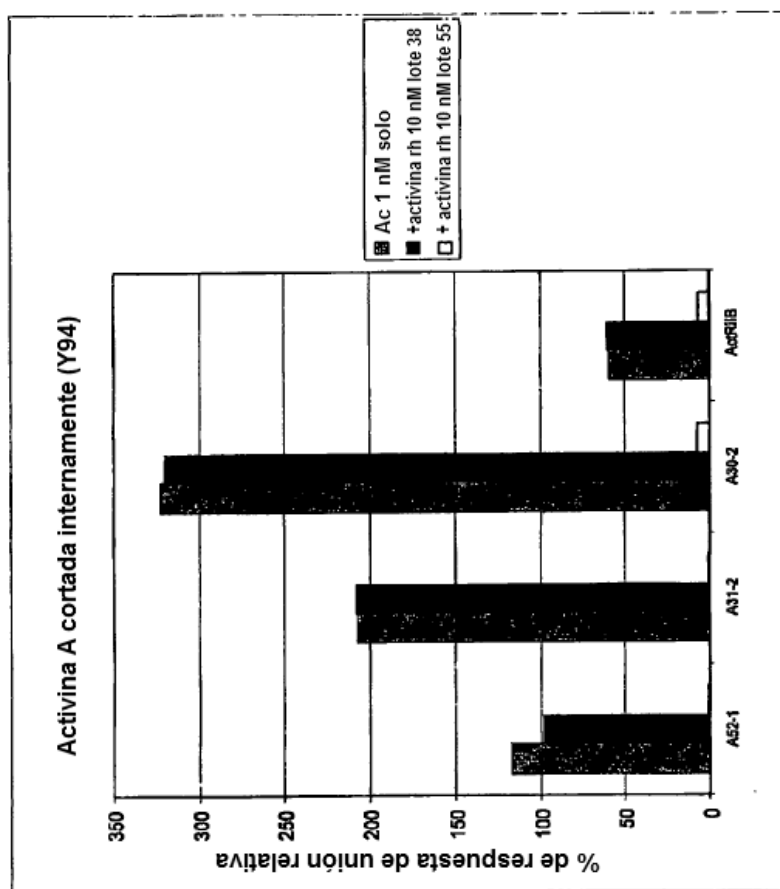


Fig. 10

Activina A rh 2 nM + Ac 20 nM sobre superficies de Ac inmovilizados

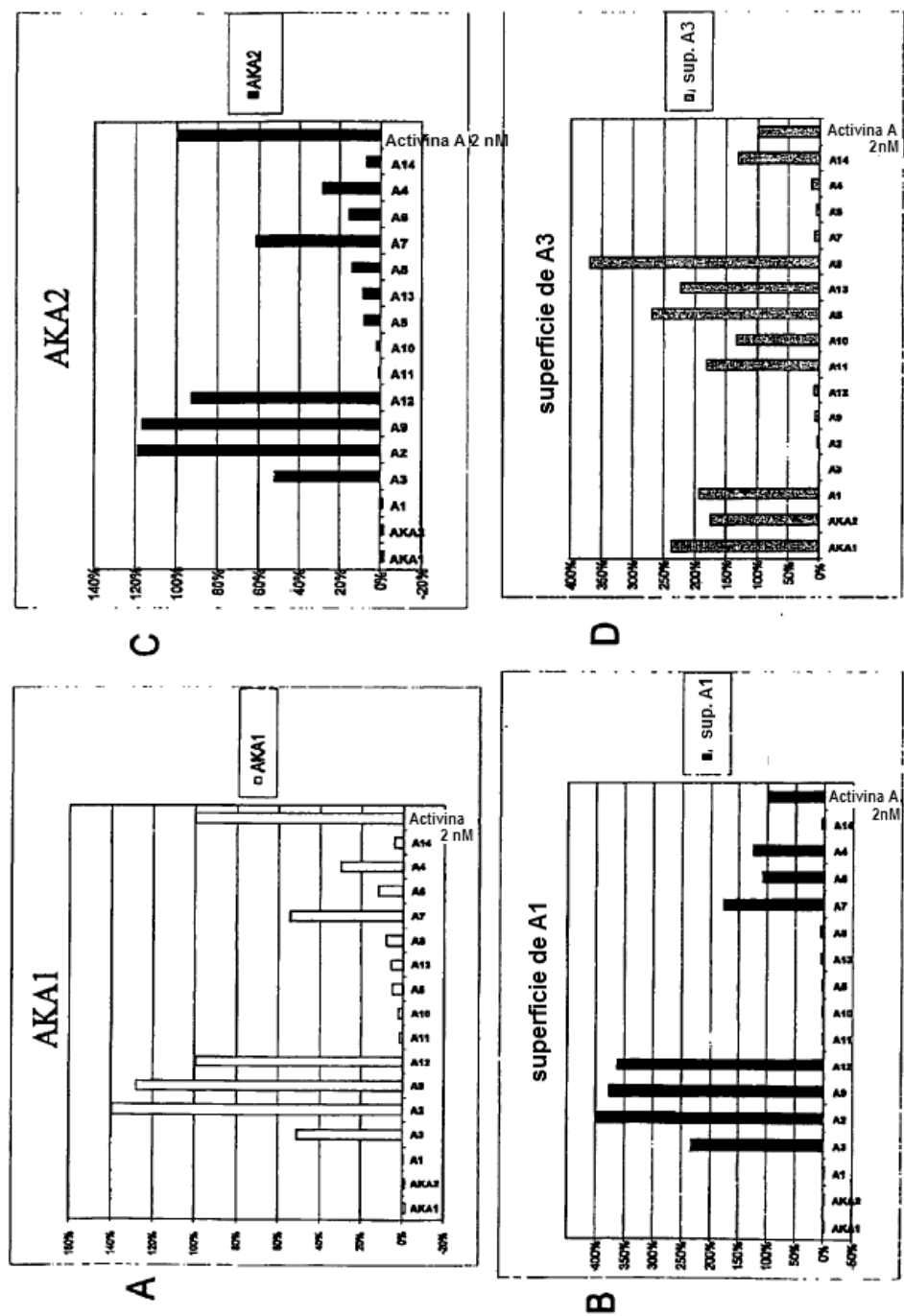


Fig. 11

Activina A 1 nM + [anticuerpo] sobre la superficie de quimera rhActRib-Fc

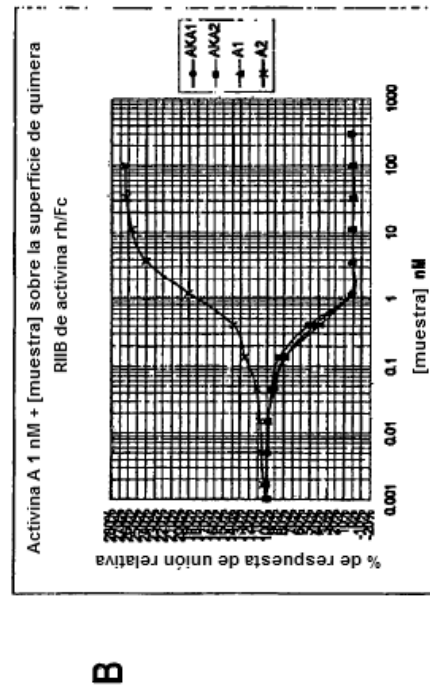
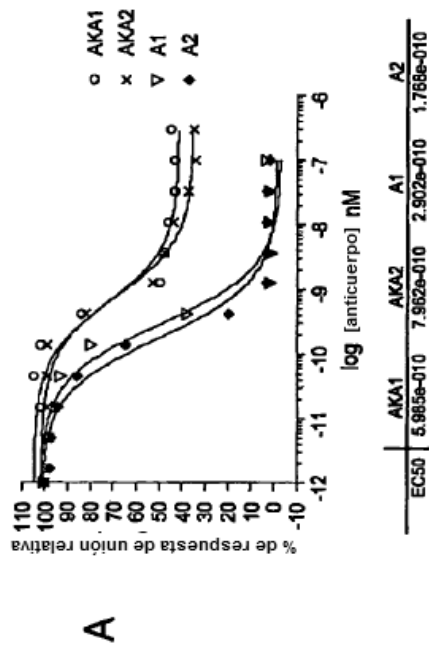


Fig. 12

Quimeras de activina A/B

	(1)	1	10	20	30	40	54
Activina A 13/39 B	(1)	GLECDGKVNICCK	QFFIDFRLIGWNDWIIAP	GGYV	YNYCEGECPSH	IAGTSGS	
Activina A B2/107 B	(1)	GLECDGKVNICCK	QFFVSEFKDIGWNDWIIAP	SGYHANYCEGECPSH	IAGTSGS		
Activina A	(1)	GLECDGKVNICCK	QFFVSEFKDIGWNDWIIAP	SGYHANYCEGECPSH	IAGTSGS		
							sección 2
	(55)	55	60	70	80	90	109
Activina A 13/39 B	(55)	SLSFHSTVINHYRM	RGHSPFANLKS	CCVETKLR	MSMLYYDDGQNI	IKKDIQNM	
Activina A B2/107 B	(55)	SLSFHSTVINHYRM	RGHSPFANLKS	CCIPETKLS	TMSTMSMLYFDD	EYNIWKADVPNM	
Activina A	(55)	SLSFHSTVINHYRM	RGHSPFANLKS	CCVETKLR	MSMLYYDDGQNI	IKKDIQNM	
							sección 3
	(109)	109	115				
Activina A 13/39 B	(109)	IVEECGCS					
Activina A B2/107 B	(109)	IVEECGCS					
Activina A	(109)	IVEECGCS					

Fig. 13

