

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 519**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/US2012/044929**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12736001 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2726099**

54 Título: **Método para tratar trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

**01.07.2011 US 201161503656 P**

**17.08.2011 US 201161524448 P**

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

**04.12.2018**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FEIGE, JEROME;  
GLASS, DAVID;  
HATAKEYAMA, SHINJI;  
RICHARDSON, BRIAN PETER y  
TRIFILIEFF, ESTELLE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 692 519 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

Método para tratar trastornos metabólicos

Campo técnico de la invención

5 Esta invención se encuentra en el campo de los anticuerpos anti-receptor de Activina IIB (ActRIIB). En particular, se refiere a composiciones que comprenden anticuerpos anti-ActRIIB y su uso para aumentar la grasa marrón en vertebrados, incluidos roedores y primates, y particularmente en humanos sin afectar significativamente a los parámetros hematológicos.

Antecedentes de la invención

10 Se pueden distinguir dos tipos de tejido adiposo que tienen características y funciones muy distintas: tejido adiposo blanco (WAT) que almacena energía principalmente como triglicéridos en distintas ubicaciones anatómicas y tejido adiposo marrón (BAT) especializado en gasto de energía basal e inducible a través de la producción de calor. BAT y WAT son distintos desde el punto de vista anatómico, histológico y funcional. Hasta hace poco, el tejido adiposo marrón (BAT) se consideraba de importancia metabólica solo en mamíferos pequeños y recién nacidos humanos, ya que se pensaba que desaparecía rápidamente después del nacimiento en humanos. Sin embargo, el tejido adiposo marrón funcional se ha identificado y caracterizado en humanos adultos promoviendo un renovado interés en la termogénesis no temblorosa y el desarrollo de perspectivas futuras dirigidas a BAT para el tratamiento farmacológico de la obesidad y las enfermedades metabólicas.

15 La última década ha sido testigo de un resurgimiento profundo en la investigación del BAT con un claro énfasis en humanos adultos. La necesidad de un aumento tan dramático se deriva de la tendencia cada vez mayor hacia la obesidad humana global. De hecho, actualmente se estima que las tasas de obesidad en los países desarrollados, como los Estados Unidos, superan el 35% de la población (Flegal, et al. 2010). La mayor incidencia de obesidad se asocia con una mayor prevalencia del Síndrome Metabólico, que incluye diabetes, hipertensión y enfermedad coronaria, entre otros (Alberti, et al. 2009, Bruce y Hanson 2010). BAT es una gran promesa en la lucha contra la obesidad dada su capacidad metabólica sin precedentes. Aunque varios estudios anatómicos iniciales sugirieron que el tejido adiposo marrón está presente en humanos adultos (Astrup, et al. 1985), se creía que su relevancia fisiológica era marginal. Estudios controlados recientes demostraron que el BAT funcional es detectable en humanos adultos flacos, obesos y mórbidamente obesos después de la exposición a un frío leve (Saito, et al. 2009, van Marken Lichtenbelt, et al. 2009, Vijgen, et al. 2011, Virtanen, et al. 2009). La actividad del BAT inducida por frío está inversamente relacionada con el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal (% de BF) (van Marken Lichtenbelt, et al. 2009, Saito, et al. 2009, Virtanen, et al. 2009, Yoneshiro, et al., Obesity, Vol. 19, No.1, enero de 2011). Se han reportado dos tipos de células de grasa marrón: células de grasa marrón que se originan en células progenitoras Myf5+ comunes a las células musculares y ejemplificadas por células grasas marrón en lugares clásicos tales como células interescapulares y de grasa parda intercaladas en WAT derivadas de otro linaje y podría surgir de una célula precursora dormida o de una transdiferenciación de la grasa blanca (Perwitz, et al. 2010, Seale, et al. 2008).

20 El fenotipo termogénico del BAT se confiere esencialmente al desacoplar la proteína 1 (UCP1). UCP1 desacopla la síntesis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) a partir de la oxidación del sustrato en adipocitos marrones.

25 El tejido adiposo marrón (BAT) es el principal sitio para la termogénesis inducida por frío y por dieta, lo que contribuye significativamente al control de la temperatura corporal y el gasto de energía, al menos en pequeños roedores como el ratón, la rata y el hámster (Cannon y Nedergaard 2004), (Klingenspor 2003), (Himms-Hagen 1990). En los seres humanos, el BAT está presente en los recién nacidos, pero desaparece rápidamente durante los períodos postnatales y, en los adultos, es bastante difícil de identificar mediante exámenes anatómicos convencionales.

30 El tejido adiposo marrón tiene una absorción muy alta de glucosa por gramo de tejido, lo que significa que a pesar de que la cantidad total de tejido adiposo marrón en el cuerpo no sea grande, puede ser potencialmente un órgano significativo para eliminar la glucosa. Las condiciones fisiológicas en las que los niveles de insulina en plasma están elevados muestran un aumento de la absorción de glucosa en el tejido adiposo marrón. El tejido adiposo marrón es uno de los tejidos más sensibles a la insulina con respecto a la estimulación de la absorción de glucosa (Cannon, Barbara y Jan Nedergaard. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance; *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004). Debido a la importancia del tejido adiposo marrón como sumidero para la absorción de glucosa, la manipulación del BAT abre nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Kajimura et al., *Nature* 460, 1154-1158, 2009).

35 Se ha descubierto que la formación y/o actividad de adipocitos marrones termogénicos se incrementó en tejido de grasa blanca de ratones tratados con antagonistas de ActRIIB (documento WO2010144452 o US201310577). Sin embargo, también se ha descubierto que el tratamiento con antagonistas de ActRIIB, por ejemplo, proteínas ActRIIB solubles produce cambios hematológicos estadísticamente significativos, que incluyen niveles elevados de reticulocitos y valores amplios de distribución de glóbulos rojos. El aumento excesivo en los niveles de glóbulos rojos o niveles amplios de hemoglobina en las células o los niveles de hematocrito pueden (i) causar aumentos en la

presión arterial, (ii) disminuir la velocidad de la sangre y (iii) aumentar el riesgo de sedimentación, trombosis o accidente cerebrovascular. En consecuencia, se ha recomendado restringir la dosificación de antagonistas de ActRIIB a pacientes que tienen parámetros hematológicos apropiados o pacientes que tienen tanto anemia como pérdida muscular (documento WO/2009/158025). Además, se ha desarrollado un método para tratar a los pacientes tratados con un antagonista de ActRIIB, que comprende controlar los parámetros hematológicos que se correlacionan con el aumento de los niveles de glóbulos rojos (documento WO2009/158025). En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar métodos novedosos para el tratamiento de trastornos metabólicos como el síndrome metabólico, la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 y/o el aumento del tejido adiposo marrón (BAT) en un paciente sin inducir cambios hematológicos significativos en dicho sujeto.

## 10 Sumario de la invención

Existe la necesidad de desarrollar nuevas composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de trastornos metabólicos como el síndrome metabólico, la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 y/o el aumento del tejido adiposo marrón (BAT) en un paciente sin inducir cambios hematológicos significativos en dicho sujeto. Este objetivo se logra mediante los métodos y composiciones proporcionados dentro de esta divulgación.

15 Un primer objetivo de la divulgación se refiere por lo tanto a una composición que comprende un anticuerpo antagonista que se une a ActRIIB para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto, donde el anticuerpo anti-ActRIIB aumenta el tejido adiposo marrón sin aumentar los niveles de glóbulos rojos en dicho sujeto y en donde el anticuerpo anti-ActRIIB se une a un dominio de unión que consiste en los aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181 (SEQ ID NO: 182); y donde el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en 20 obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, lipodistrofia, tolerancia alterada a la glucosa, concentración elevada de insulina en plasma, resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular y afecciones respiratorias.

Las composiciones divulgadas también son adecuadas para tratar a un sujeto que padece un trastorno metabólico y muscular. En una realización, el trastorno muscular es una atrofia muscular seleccionada del grupo que consiste en 25 sarcopenia asociada a la obesidad, sarcopenia o atrofia muscular asociada a la diabetes.

En otra realización, la composición comprende un anticuerpo anti-ActRIIB que se une a un dominio de unión que consiste en los aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181 (SEQ ID NO: 182), o a un epítipo que comprende o que consiste en (a) aminoácidos 78-83 de la SEQ ID NO: 181 (WLDDFN - SEQ ID NO: 188); (b) aminoácidos 76-84 de la 30 SEQ ID NO: 181 (GCWLDDFNC - SEQ ID NO: 186); (c) aminoácidos 75-85 de la SEQ ID NO: 181 (KGCWLDDFNCY - SEQ ID NO: 190); (d) aminoácidos 52-56 de la SEQ ID NO: 181 (EQDKR - SEQ ID NO: 189); (e) aminoácidos 49-63 de la SEQ ID NO: 181 (CEGEQDKRLHCYASW - SEQ ID NO: 187); (f) aminoácidos 29-41 de la SEQ ID NO: 181 (CIYYNANWELERT - SEQ ID NO: 191); (g) aminoácidos 100 - 110 de la SEQ ID NO: 181 (YFCCCEGNFCN - SEQ ID NO: 192); o (h) aminoácidos 78-83 de la SEQ ID NO: 181 (WLDDFN) y aminoácidos 52-56 de la SEQ ID NO: 181 (EQDKR).

35 En aún otra realización alternativa, las composiciones mencionadas anteriormente comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB que se une a ActRIIB con una afinidad 10 veces o mayor que con la que se une a ActRIIA.

Además, la divulgación se refiere a una composición en la que el anticuerpo anti-ActRIIB comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-14; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una 40 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15-28; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 43-56; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 57-70; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos 45 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 71-84.

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones en las que el anticuerpo anti-ActRIIB comprende: (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de la región variable de la 50 cadena pesada de la SEQ ID NO: 15; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 29; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 43; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 57; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, (b) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 2; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 16; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 30; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 44; una CDR2 de la región variable de la 55 cadena ligera de la SEQ ID NO: 58; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 72, (c) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 17; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 31; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 45; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 59; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 73, (d)



ligera variable de la SEQ ID NO: 97; o (n) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 112 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 98.

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a las composiciones descritas anteriormente, en donde el anticuerpo anti-ActRIIB comprendido comprende (a) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 146 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 141; (b) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 147 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 142; (c) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 148 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 143; (d) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 149 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 144; (e) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 150 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 145; (f) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 156 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 151; (g) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 157 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 152; (h) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 158 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 153; (i) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 159 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 154; o (j) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 160 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 155.

Un objetivo adicional de la divulgación se refiere a la composición, donde (i) el anticuerpo anti-ActRIIB bloquea en forma cruzada o es bloqueado en forma cruzada por uno de los anticuerpos descritos anteriormente, (ii) tiene una función efectora alterada a través de la mutación de la región Fc y/o (iii) se une a un epítipo reconocido por uno de los anticuerpos descritos anteriormente.

En aún otra realización, la composición divulgada comprende un anticuerpo anti-ActRIIB codificado por pBW522 (DSM22873) o pBW524 (DSM22874).

Además, la divulgación proporciona un método para disminuir la concentración promedio de glucosa en plasma en un sujeto mientras no aumenta los niveles de glóbulos rojos y/o sin producir un cambio clínicamente inaceptable en los niveles de hematocrito u otros parámetros sanguíneos, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une a ActRIIB. En ciertos aspectos, la concentración promedio de glucosa en plasma se detecta midiendo los niveles de hemoglobina glicada (hemoglobina glicosilada).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno metabólico, como los descritos anteriormente, en un sujeto, en el que el sujeto padece un trastorno metabólico y un trastorno muscular. En otra realización, el trastorno muscular mencionado anteriormente es una atrofia muscular seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia asociada a la obesidad, sarcopenia, o atrofia muscular asociada a la diabetes.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: El receptor de activina IIB inhibe la diferenciación de los adipocitos marrones primarios. Los preadipocitos marrones primarios aislados de tejido adiposo marrón interescapular de ratón se diferenciaron durante 9 días utilizando un medio adipogénico clásico (AM) que contiene insulina y hormona tiroidea para todo el protocolo e IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina, dexametasona e indometacina por los primeros dos días. Medio adipogénico (AM), AM + miostatina (Mstn; 10 ng/mL), un anticuerpo monoclonal contra el receptor de activina IIB (AM + MOR08159 (anticuerpo que comprende la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 146 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 141), 10 µg/mL) o una combinación de ambos (AM + MOR08159 + Mstn); se añadió al medio adipogénico y medio fresco y los tratamientos se reemplazaron cada 2 días. El nivel de diferenciación se evaluó midiendo la expresión de ARNm de marcadores clásicos de grasa marrón como UCP1 de 2 cultivos independientes para cada condición (PRDM16: dominio PR que contiene 16, PGC-1a/b: receptor activado proliferativo de peroxisoma, gamma, coactivador 1 alfa).

Figura 2: la inhibición de ActRIIB en ratones aumenta la cantidad de grasa marrón pero no la blanca. Se trataron ratones SCID (deficiencia combinada/inmunológica severa) (n = 12/grupo) durante 4 semanas con una inyección subcutánea semanal de anticuerpo de control (IgG1; 20 mg/kg/semana) o cantidades crecientes de un anticuerpo monoclonal humano contra ActRIIB (MOR08159; 2, 6 y 20 mg/kg/semana). Se midió la masa húmeda del músculo gastrocnemio, el tejido adiposo marrón interescapular (BAT) y el tejido adiposo blanco epididimal (WAT) y se expresó como un cambio porcentual respecto del promedio del grupo de control.

Figura 3: la inhibición de ActRIIB aumenta la tolerancia al frío. La tolerancia al frío se evaluó colocando ratones C57BL6/J (n = 11/grupo) que habían sido tratados durante 3 semanas con una inyección subcutánea semanal de vehículo o una variante de ratón del anticuerpo monoclonal contra ActRIIB (anticuerpo quimérico que comprende la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 194 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 193, 20 mg/kg/semana) a 10°C durante 4 h y midiendo la temperatura corporal rectal cada hora.

Figura 4: la inhibición de ActRIIB aumenta la respiración celular de la grasa marrón. Los adipocitos marrones primarios se diferenciaron y trataron como se describe en la figura 1 (n = 10-20 por condición) y la tasa de consumo de oxígeno se midió en condiciones basales o en presencia de 2,5 µg/mL de oligomicina (desacoplada) o FCCP final 500 nM (carbonilcianuro-p-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona) (máxima).

### Definiciones generales

Para que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término "que comprende" significa "que incluye", por ejemplo, una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

5 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

El término "cambios hematológicos" se refiere a cambios en los parámetros hematológicos como los niveles de glóbulos rojos (RBC: conteo absoluto de glóbulos rojos), ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW) o concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC). En una realización preferida, el término se refiere a un aumento de al menos uno de los parámetros mencionados anteriormente. En otras palabras, los "cambios hematológicos" en el contexto de la enseñanza divulgada se refieren al hecho de que el tratamiento de un sujeto con las composiciones divulgadas no conduce a un aumento estadísticamente significativo en RBC, RDW y/o MCHC en dicho sujeto. Los valores de RBC, RDW y/o MCHC pueden determinarse usando métodos reconocidos en la técnica. El experto en la materia conoce el recuento de glóbulos rojos fisiológicamente normales. Los niveles de RBC se pueden determinar contando los glóbulos rojos (usando el contador Coulter comercialmente disponible), mediante mediciones del nivel de hemoglobina o de hematocrito. El hematocrito (Hct) o volumen de células empaquetadas (PCV) se refiere a la relación entre el volumen de glóbulos rojos y el volumen de sangre total. El hematocrito se puede determinar, por ejemplo, mediante centrifugación de una muestra de sangre seguida de análisis de las capas producidas. Los intervalos fisiológicos normales de hematocrito para hombres y para mujeres son conocidos por los expertos en la materia.

10 Los niveles de hematocrito en el cuerpo del animal humano o mamífero son principalmente un porcentaje de los glóbulos rojos en una cierta cantidad de plasma. Por ejemplo, cuando se realiza una prueba de sangre, las lecturas se mostrarán en el informe del análisis de sangre como niveles de HCT del 40%. Esto es indicativo del hecho de que por cada 100 mililitros de sangre en el cuerpo del paciente, aproximadamente 40 mililitros de este son principalmente glóbulos rojos. Los niveles de hemoglobina se pueden determinar mediante la lisis de los glóbulos rojos y la conversión de la hemoglobina en cianometahemoglobina y la medición de la hemoglobina con un colorímetro. El experto en la materia conoce los niveles fisiológicamente normales de hemoglobina en hombres y mujeres adultos.

15 La frase "no aumento de los niveles de glóbulos rojos" o "sin aumento de los niveles de glóbulos rojos" en un sujeto se refiere a una afección en la que el nivel de glóbulos rojos (por ejemplo, RBC), hematocrito o hemoglobina no aumenta significativamente en comparación con el nivel de glóbulos rojos, hematocritos o hemoglobina en dicho paciente antes de un tratamiento de dosis única o múltiple hasta tres meses después del inicio del tratamiento. En consecuencia, un aumento en los niveles de glóbulos rojos daría lugar a cambios clínicamente inaceptables en el hematocrito u otro nivel de parámetros sanguíneos en un sujeto.

20 "No aumento de los niveles de glóbulos rojos" o "sin aumento de los niveles de glóbulos rojos" en un sujeto con niveles de glóbulos rojos aceptables o normales también se refiere a una condición en la que los niveles de glóbulos rojos, hematocrito o hemoglobina no aumentan más allá del intervalo aceptado o normal. Los niveles normales de hematocrito en niños a la edad de aproximadamente 10 años estarán entre aproximadamente 36 y aproximadamente 40%, mientras que las mujeres adultas mostrarán lecturas de entre aproximadamente 36% y aproximadamente 46% con hombres adultos que reflejan las lecturas entre aproximadamente 41 y aproximadamente 54%. Cualquier lectura fuera de estos intervalos normales, siempre que los valores del individuo tratado antes del tratamiento no estén por encima de dichos intervalos, se considerará como una condición en la que los niveles de glóbulos rojos se incrementan. El nivel de hemoglobina se expresa como la cantidad de hemoglobina en gramos (g) por decilitro (dL) de sangre entera, siendo un decilitro 100 mililitros. Los intervalos normales para la hemoglobina dependen de la edad y, a partir de la adolescencia, del sexo de la persona. Los intervalos normales son: niños: alrededor de 11-13 g/dL, hombres adultos: alrededor de 14-18 g/dL, mujeres adultas: alrededor de 12-16 g/dL, hombres después de la edad mediana: alrededor de 12,4-14,9 g/dL, mujeres después de la mediana edad: alrededor de 11,7-13,8 g/dL. Cualquier nivel de hemoglobina fuera de estos intervalos normales, siempre que los valores del individuo tratado antes del tratamiento no estén por encima de dichos intervalos, se considerará como una condición en la que los niveles de glóbulos rojos se incrementan. La frase "no aumento de los niveles de glóbulos rojos" o "sin aumento de los niveles de glóbulos rojos" en un sujeto se refiere a una condición en la que se evita un aumento del hematocrito desde el intervalo normal hasta más allá del intervalo aceptado de normalidad.

25 Lo siguiente ejemplifica un posible régimen de tratamiento preclínico para evaluar los posibles efectos de un tratamiento con un anticuerpo ActRIIB. El tratamiento se ejemplifica usando monos cynomolgus, pero los experimentos descritos no están limitados a monos y el experto sabe cómo establecer experimentos adecuados o regímenes de dosificación para otras especies, en particular para seres humanos: el anticuerpo ActRIIB se puede administrar una vez a la semana durante 3 meses a monos cynomolgus macho y hembra por inyección intravenosa. Se pueden asignar 32 monos cynomolgus (16/sexo) a uno de cuatro grupos de tratamiento (3 a 5 animales/sexo/grupo) y se pueden administrar inyecciones intravenosas de cualquiera de los vehículos o del anticuerpo ActRIIB a razón de 10, 30 o 100 mg/kg una vez por semana durante 13 semanas (un total de 14 dosis; las dosis se seleccionarán en función de la actividad de hipertrofia muscular en el mono).

5 La frase "aumento de la concentración promedio de glucosa en plasma" se refiere a una situación fisiológica en un paciente en el que se consideraría la concentración de glucosa en plasma (concentración de azúcar en sangre o nivel de glucosa en sangre o presencia de glucosa en la sangre de un ser humano o animal) por una persona capacitada como fuera del intervalo normal de un individuo sano. Los niveles de glucosa en sangre se miden en concentración molar (milimoles por litro o milimolar, abreviado mM). El experto conoce los niveles normales de glucosa en sangre en los mamíferos, que están estrechamente regulados como parte de la homeostasis metabólica. Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre fluctúan a lo largo del día (más bajos en la mañana y aumentan después de las comidas).

10 La hemoglobina glicada (hemoglobina glicosilada, hemoglobina A1c, HbA1c, A1C o Hb1c, a veces también HbA1c) es una forma de hemoglobina que se mide principalmente para identificar la concentración promedio de glucosa en plasma durante periodos de tiempo prolongados. Se forma en una vía de glicosilación no enzimática por la exposición de la hemoglobina a la glucosa en plasma. Los niveles normales de glucosa producen una cantidad normal de hemoglobina glicada. A medida que aumenta la cantidad promedio de glucosa en plasma, la fracción de hemoglobina glicada aumenta de manera predecible. Por lo tanto, la hemoglobina glicada sirve como un marcador para los niveles promedio de glucosa en sangre. Los métodos para determinar el nivel de hemoglobina glicada - como métodos confiables para evaluar el control glicémico - son bien conocidos en la técnica (HB Chandalia y RR Krishnaswamy, Current Science, Vol. 83, No. 12, 25 de diciembre de 2002).

20 La frase "aumenta el tejido adiposo marrón" o "aumento en el tejido adiposo marrón (BAT)" se refiere a (i) un aumento en la masa húmeda de tejido adiposo marrón (BAT) interescapular medido y expresado como un cambio porcentual del promedio de un grupo de control definido, en el que el aumento es estadísticamente significativo y está influenciado por la cantidad de anticuerpo ActRIIB administrado y las composiciones que comprenden el mismo; o (ii) una mejora en la diferenciación de los adipocitos marrones primarios como se refleja por un aumento en la expresión de genes termogénicos tales como UCP-1. Además, el tejido adiposo marrón puede analizarse utilizando una tomografía de emisión de positrones y una tomografía computarizada (Cypess et al., 2009, N Engl J Med 360: 25 1509-1517).

El término "tejido adiposo marrón" en el contexto de esta invención se debe entender que también se refiere a los términos "grasa marrón", "adipocitos marrón" y "adipocitos termogénicos", que se usan indistintamente.

30 El término "trastorno metabólico" como se usa en el contexto de esta invención se refiere a una enfermedad o condición que se ve afectada por la presencia, nivel o actividad del tejido adiposo marrón, concentración de glucosa en plasma, nivel de insulina en plasma y/o contenido de grasa corporal. Un trastorno o afección metabólica también incluye, entre otros, síndrome metabólico, tolerancia alterada a la glucosa, concentraciones elevadas de insulina en plasma y resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertensión, lipodistrofia, enfermedad cardiovascular, problemas o afecciones respiratorias. Los trastornos metabólicos de particular interés son la diabetes mellitus tipo 2 (también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente o diabetes de inicio en adultos), que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre en el contexto de resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina, obesidad, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, problemas respiratorios. La diabetes tipo 2, o diabetes insulino dependiente (es decir, diabetes mellitus no insulino dependiente), a menudo se produce frente a los niveles normales, o incluso elevados, de insulina y parece ser el resultado de la incapacidad de los tejidos para responder adecuadamente a la insulina. La mayoría de los diabéticos tipo II también son obesos.

40 El término "obesidad" se refiere a una condición fisiológica de un individuo en el que hay un exceso de grasa corporal diagnosticado por un médico. La obesidad puede calcularse usando el índice de masa corporal (IMC: peso corporal por altura en metros al cuadrado). Según este sistema, la obesidad se define como un sujeto saludable que tiene un IMC mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup>, o una condición por la cual un sujeto con al menos una comorbilidad tiene un IMC mayor o igual a 27 kg/m<sup>2</sup>.

45 Los términos "ActRIIA" y "ActRIIB" se refieren a receptores de Activina. Las activinas señalizan a través de un complejo heterodímero de receptores serina quinasa que incluyen al menos dos receptores de tipo I (I y IB) y dos de tipo II (II y IIB, también conocidos como ACVR2A y ACVR2B). Estos receptores son todas proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad predicha de serina/treonina. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización, mientras que los receptores de tipo II son necesarios para unirse a ligandos y para la expresión/reclutamiento de receptores de tipo I. Los receptores de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando que da como resultado la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II. El receptor de activina II B (ActRIIB) es un receptor para la miostatina.

55 El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (por ejemplo, anticuerpos, citoquinas y complemento) que da como resultado un daño selectivo, destrucción o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "actividad de señalización" se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada por una interacción proteína-proteína tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, dando como resultado la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. En general, la transmisión implica la fosforilación específica de uno o más residuos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas en la serie de reacciones que provocan la transducción de señales. Los penúltimos procesos típicamente incluyen eventos nucleares, lo que resulta en un cambio en la expresión génica.

El término ActRIIB o receptor de Act IIB se refiere a ActRIIB humano como se define en la SEQ ID NO: 181 (AAC64515.1, GI: 3769443). Los anticuerpos anti-ActRIIB policlonales y monoclonales de calidad para investigación son conocidos en la técnica, tales como los fabricados por R & D Systems®, MN, EE.UU. Por supuesto, se podrían generar anticuerpos contra ActRIIB de otras especies y se podrían usar para tratar afecciones patológicas en esas especies.

El término "anticuerpo" tal como se denomina en la presente memoria incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, C<sub>L</sub>. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), como se usa en el presente documento, se refiere a la longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, una porción de ActRIIB). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab, cada uno de los cuales se une al mismo antígeno, mediante un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., 1989. Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden incluirse dentro de la expresión "región de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a ActRIIB está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de ActRIIB). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a ActRIIB puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de ActRIIB de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos "bloquear en forma cruzada", "bloqueado en forma cruzada" y "bloqueo cruzado" se usan indistintamente en este documento para significar la capacidad de un anticuerpo u otro agente aglutinante para interferir con la unión de otros anticuerpos o agentes aglutinantes a ActRIIB, particularmente el dominio de unión al ligando, en un ensayo de unión competitivo estándar.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usan en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco de consenso derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como las descritas en Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57 - 86).

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tiene regiones variables en las que tanto la región marco como la región CDR se derivan de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique un empalme de todo o parte de secuencias génicas de inmunoglobulina humana, con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, en mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG2) que es proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en este documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente al polipéptido ActRIIB" se refiere a un anticuerpo que se une al polipéptido ActRIIB humano con una K<sub>D</sub> de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos. Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada con un antígeno distinto de ActRIIB" se refiere a un anticuerpo que se une a ese antígeno con una K<sub>D</sub> de 10 x 10<sup>-9</sup> M o menos, 5 x 10<sup>-9</sup> M o menos, o 2 x 10<sup>-9</sup> M o menos. Un anticuerpo que "no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular" se refiere a un anticuerpo que se une a ese antígeno, con una K<sub>D</sub> de 1,5 x 10<sup>-8</sup> M o mayor, o una K<sub>D</sub> de 5-10 x 10<sup>-8</sup> M, o 1 x 10<sup>-7</sup> M o mayor. En ciertas realizaciones, dichos anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el antígeno presentan una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión estándar. K<sub>D</sub> puede determinarse utilizando un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore® o una valoración de equilibrio de la solución.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo antagonista" se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de señalización inducida por ActRIIB en presencia de miostatina o de otros ligandos del ActRIIB tales como activinas o GDF-11. Los ejemplos de un ensayo para detectar esto incluyen la inhibición de la señalización inducida por miostatina (por ejemplo mediante un ensayo del gen informador dependiente de Smad), la inhibición de la fosforilación de Smad inducida por miostatina (ELISA de P-Smad) y la inhibición de la inhibición inducida por miostatina de la diferenciación de células del músculo esquelético (por ejemplo, por un ensayo de creatina quinasa).

En algunas realizaciones, los anticuerpos inhiben la señalización inducida por miostatina medida en un ensayo del gen informador dependiente de Smad a una IC<sub>50</sub> de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos.

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo con "actividad no agonista" se refiere a un anticuerpo que no aumenta significativamente la actividad de señalización mediada por ActRIIB en ausencia de miostatina en un ensayo basado en células, tal como la inhibición de la señalización inducida por miostatina (por ejemplo, mediante un ensayo del gen informador dependiente de Smad), la inhibición de la fosforilación de Smad inducida por miostatina (ELISA de P-Smad) y la inhibición de la inhibición inducida por miostatina de la diferenciación de células

del músculo esquelético (por ejemplo, mediante un ensayo de creatina quinasa). Tales ensayos se describen con más detalles en los ejemplos a continuación.

El término " $K_{asoc}$ " o " $K_a$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " $K_{dis}$ " o " $K_d$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término " $K_D$ ", como se usa en este documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de  $K_d$  a  $K_a$  (es decir,  $K_d/K_a$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, tal como el sistema biosensor de Biacore®, o la valoración de equilibrio de solución (SET) (véase Friguet B et al. (1985) J. Immunol Methods; 77 (2): 305 - 319, y Hanel C et al. (2005) Anal Biochem; 339 (1): 182-184).

Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

Como se usa en este documento, el término "avidez" se refiere a una medida informativa de la estabilidad global o la fuerza del complejo anticuerpo-antígeno. Está controlada por tres factores principales: afinidad del epítipo del anticuerpo; la valencia del antígeno y el anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se una a un epítipo de antígeno preciso.

Como se usa en el presente documento, el término actividad de "ADCC" o de "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" se refiere a la actividad de reducción de células B humanas. La actividad de ADCC se puede medir mediante los ensayos de reducción de células B humanas conocidas en la técnica.

Para obtener una sonda de avidez más alta, se puede construir un conjugado dimérico (dos moléculas de una proteína de anticuerpo acoplada a un marcador FACS), lo que hace que las interacciones de baja afinidad (como con el anticuerpo de línea germinal) se detecten más fácilmente por FACS. Además, otro medio para aumentar la avidez de la unión al antígeno implica generar dímeros, trímeros o multímeros de cualquiera de los constructos descritos en la presente memoria de los anticuerpos anti-ActRIIB. Tales multímeros pueden generarse a través de unión covalente entre módulos individuales, por ejemplo, imitando la unión del terminal C con el N naturales o imitando dímeros de anticuerpo que se mantienen juntos a través de sus regiones constantes. Los enlaces modificados en la interfaz Fc/Fc pueden ser covalentes o no covalentes. Además, los compañeros de dimerización o multimerización distintos de Fc pueden usarse en híbridos de ActRIIB para crear tales estructuras de orden superior. Por ejemplo, es posible usar dominios multimerizantes tales como el dominio trimerizante descrito en el documento WO2004/039841 o el dominio pentamerizante descrito en el documento WO98/18943.

Como se usa en este documento, el término "selectividad" para un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que se une a un cierto polipéptido objetivo pero no a polipéptidos estrechamente relacionados.

Como se usa en este documento, el término "alta afinidad" para un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de 1 nM o menos para un antígeno objetivo. Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Como se usa en este documento, el término "optimizado" significa que una secuencia de nucleótidos se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se modifica por ingeniería genética para retener por completo o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia "parental". Las secuencias optimizadas en este documento han sido modificadas para tener codones que son preferidos en células de mamífero CHO, sin embargo, también se prevé aquí la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se conocen como optimizadas.

#### Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que los anticuerpos dirigidos al receptor ActRIIB pueden evitar que la miostatina se una al receptor, influyendo así en la homeostasis de la glucosa y/o el metabolismo de la grasa en un sujeto sin afectar negativamente a los parámetros hematológicos en dicho sujeto.

- Esto conduce a efectos metabólicos o fisiológicos como un aumento en el tejido adiposo marrón, homeostasis mejorada de la glucosa, normalización de los niveles de insulina, disminución en la concentración promedio de glucosa en plasma y/o disminución de la hemoglobina glicosilada en un paciente/sujeto. Una ventaja adicional de la enseñanza divulgada reside en el hecho de que no es necesario controlar los parámetros hematológicos antes, durante o después de la administración de las composiciones de la invención. Además, en comparación con los métodos de la técnica anterior, no hay necesidad de restringir el tratamiento de las composiciones divulgadas a pacientes/sujetos que tienen parámetros hematológicos apropiados. Por ejemplo, los pacientes/sujetos que tienen un nivel de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito por encima de lo normal también pueden ser tratados. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo antagonista que se une a ActRIIB para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto, donde el anticuerpo anti-ActRIIB aumenta el tejido adiposo marrón sin aumentar los niveles de glóbulos rojos en dicho sujeto y el anticuerpo anti-ActRIIB se une a un dominio de unión que consiste en los aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181 (SEQ ID NO: 182); y donde el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, lipodistrofia, tolerancia alterada a la glucosa, concentración elevada de insulina en plasma, resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular y afecciones respiratorias.
- En una realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada se unen a ActRIIB con una  $K_D$  de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos. Preferiblemente, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada se unen a ActRIIB con una afinidad de 100 pM o menos (es decir, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 1 pM o menos).
- En una realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada se unen a ActRIIB con una afinidad de entre 10 y 20 pM.
- En una realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada no reaccionan de forma cruzada con una proteína relacionada con ActRIIB, particularmente no reaccionan de forma cruzada con ActRIIA humana (NP\_001607.1, GI: 4501897), más particularmente, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada se unen a ActRIIB con una afinidad 5 veces mayor que cuando se une a ActRIIA, más preferiblemente 10 veces, aún más preferiblemente 50 veces, aún más preferiblemente 100 veces.
- En una realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada se unen a ActRIIA con una afinidad de 100 pM o más (es decir, 250 pM, 500 pM, 1 nM, 5 nM o más).
- En una realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada son del isotipo IgG2.
- En otra realización, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada son del isotipo IgG1. En una realización adicional, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada son del isotipo IgG1 y tienen una función efectora alterada a través de la mutación de la región Fc. Dicha función efectora alterada puede ser una actividad de ADCC y de CDC reducida. En una realización, dicha función efectora alterada es ADCC silenciada y actividad de CDC.
- En otra realización relacionada, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada son anticuerpos IgG1 completamente humanos o humanizados sin actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o actividad de CDC y se unen a una región de ActRIIB que consiste en los aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181.
- En otra realización relacionada, los anticuerpos comprendidos en la composición divulgada son anticuerpos IgG1 totalmente humanos o humanizados con actividad de citotoxicidad celular reducida dependiente de anticuerpo (ADCC) o actividad de CDC y se unen a una región de ActRIIB que consiste en aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181.
- La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden anticuerpos ActRIIB humanos o humanizados para uso en el tratamiento de un sujeto para aumentar el tejido adiposo marrón mientras que no aumenta los niveles de glóbulos rojos.
- La aplicación de las composiciones divulgadas conduce a una reducción de la concentración promedio de glucosa en plasma, la normalización de la homeostasis de glucosa y/o las concentraciones de insulina en plasma mientras que no aumenta los niveles de glóbulos rojos en dicho sujeto. La concentración promedio de glucosa en plasma puede medirse determinando el nivel de hemoglobina glicada (hemoglobina glicosilada, hemoglobina A1c, HbA1c, A1C, Hb1c o HbA1c, HB Chandalia y PR Krishnaswamy, Current Science, Vol. 83, No. 12, 25 de diciembre de 2002).
- En una realización alternativa, la divulgación se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo que se une a ActRIIB para su uso de acuerdo con las presentes reivindicaciones en el tratamiento de un sujeto para disminuir la concentración promedio de glucosa en plasma en un sujeto, mientras que no aumenta los niveles de glóbulos rojos.
- En otra realización, el paciente tratado con las composiciones divulgadas padece un trastorno metabólico o fisiológico y muscular. Hay muchas causas de trastornos musculares (por ejemplo, atrofia), que incluyen como resultado del tratamiento con un glucocorticoide como cortisol, dexametasona, betametasona, prednisona, metilprednisolona o prednisolona. La atrofia muscular también puede ser el resultado de una denervación debida a

un traumatismo nervioso o un resultado de neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (por ejemplo, síndrome de Guillian-Barré, neuropatía periférica o exposición a toxinas o fármacos ambientales).

Además, la atrofia muscular puede ser un resultado de miopatía, tal como la miotonía; una miopatía congénita, que incluye miopatía nemalínica, miopatía multi/minicore y miopatía miotubular (centronuclear); miopatía mitocondrial; parálisis periódica familiar; miopatía inflamatoria; miopatía metabólica, tal como la causada por una enfermedad de almacenamiento de glicógeno o lípido; dermatomiositosis; polimiositosis; miositis por cuerpos de inclusión; miositis osificante; rabdomiólisis y mioglobinurias. Además, el término atrofia muscular también se relaciona con la sarcopenia asociada a la obesidad, la sarcopenia o la atrofia muscular asociada a la diabetes.

La miopatía puede ser causada por un síndrome de distrofia muscular, como Duchenne, Becker, miotónica, fascioescapulohumeral, Emery-Dreifuss, oculofaríngea, escapulohumeral, de cinturas, Fukuyama, una distrofia muscular congénita o miopatía distal hereditaria. La enfermedad musculoesquelética también puede ser osteoporosis, una fractura ósea, baja estatura o enanismo.

Además, la atrofia muscular puede ser el resultado de una enfermedad neuronal motora adulta, atrofia muscular espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal juvenil, neuropatía motora autoinmune con bloqueo conductor multifocal, parálisis por accidente cerebrovascular o lesión de la médula espinal, inmovilización esquelética debido a trauma, reposo prolongado en cama, inactividad voluntaria, inactividad involuntaria, estrés metabólico o insuficiencia nutricional, cáncer, SIDA, ayuno, trastorno de la glándula tiroides, hipotonía congénita benigna, enfermedad del núcleo central, quemaduras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades hepáticas (ejemplos tales como fibrosis, cirrosis), sepsis, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca congestiva, envejecimiento, viajes espaciales o tiempo pasado en un entorno de gravedad cero.

Algunos ejemplos de afecciones relacionadas con la edad que pueden tratarse incluyen sarcopenia, atrofia cutánea o pérdida de masa muscular.

El tratamiento puede conducir a la ausencia total de un trastorno metabólico. En este contexto, el término "ausencia total" se refiere a las condiciones fisiológicas o el estado de una persona que, sobre la base de la medición del parámetro fisiológico/metabólico pertinente, sería considerado por un experto como saludable (todos los parámetros están dentro del intervalo normal). El experto es consciente del parámetro fisiológico/metabólico relevante y de cómo determinarlos. Dichos parámetros serán seleccionados por una persona experta (por ejemplo, un médico) sobre la base de la condición relacionada con la edad o el trastorno metabólico investigado. Los resultados del tratamiento también pueden ser parciales, de modo que la peculiaridad del trastorno metabólico en un sujeto es significativamente menos pronunciada que si el sujeto no hubiera recibido una composición de la presente invención. Los resultados parciales del tratamiento pueden ser una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la discapacidad debido a la enfermedad. En este contexto, el término "trastorno metabólico significativamente menos pronunciado" se refiere a las condiciones fisiológicas o el estado de una persona que, sobre la base de la medición del parámetro fisiológico/metabólico relevante, después del tratamiento con las composiciones de la invención, no será considerado por una persona experta como completamente sana (los parámetros pueden estar todavía fuera del intervalo normal), pero donde se ha observado una mejora significativa (que podría ser un aumento o disminución de un cierto parámetro) del parámetro fisiológico/metabólico relevante. Se puede identificar una mejora o disminución significativa, por ejemplo, mediante la comparación de los resultados del tratamiento de pacientes individuales en comparación con los individuos de un grupo control o placebo.

Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos frente a ActRIIB de diversas especies, que incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias Western y RIA. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La afinidad de unión de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como análisis Biacore o valoración de equilibrio de solución. Las técnicas basadas en resonancia de plasmón superficial tales como Biacore pueden determinar la cinética de unión que permite el cálculo de la afinidad de unión. Ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de ActRIIB (por ejemplo, unión al receptor, prevención o inducción de la proliferación de células B humanas o producción de IgG) se describen con más detalle en los Ejemplos.

Por consiguiente, se entenderá que un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de ActRIIB (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas) como determinadas de acuerdo con las metodologías conocidas en la técnica y descritas en la presente memoria, se relaciona con una disminución estadísticamente significativa en la actividad particular con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). Un anticuerpo que inhibe la actividad de ActRIIB produce tal disminución estadísticamente significativa en al menos 10% del parámetro medido, en al menos 50%, 80% o 90%, y en ciertas realizaciones un anticuerpo de la invención puede inhibir más de 95%, 98% o 99% de la actividad funcional de ActRIIB.

La capacidad o el grado en el que un anticuerpo u otro agente de unión puede interferir con la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a ActRIIB y, por lo tanto, si puede decirse que bloquea en forma cruzada de acuerdo con la descripción, puede determinarse usando ensayos de unión de competición estándar. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, usando un instrumento BIACore (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el alcance de las interacciones usando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo para medir el bloqueo cruzado utiliza un enfoque basado en ELISA. Un ensayo adicional usa análisis de FACS, en el que se prueba la competencia de diversos anticuerpos para unirse a células que expresan ActRIIB (tal como se describe en los Ejemplos).

De acuerdo con la descripción, un anticuerpo de bloqueo cruzado u otro agente de unión de acuerdo con la divulgación se une a ActRIIB en el ensayo de bloqueo cruzado BIACore descrito de modo que la unión registrada de la combinación (mezcla) de los anticuerpos o agentes de unión está entre 80% y 0,1% (por ejemplo, 80% a 4%) de la unión teórica máxima, específicamente entre 75% y 0,1% (por ejemplo, 75% a 4%) de la unión teórica máxima, y más específicamente entre 70% y 0,1% (por ejemplo, 70 % a 4%), y más específicamente entre 65% y 0,1% (por ejemplo, 65% a 4%) de unión teórica máxima (como se definió anteriormente) de los dos anticuerpos o agentes de unión en combinación.

Un anticuerpo se define como bloqueo cruzado de un anticuerpo anti-ActRIIB de la divulgación en un ensayo ELISA, si el anticuerpo de prueba puede causar una reducción de la unión del anticuerpo anti-ActRIIB a ActRIIB de entre 60% y 100%, específicamente entre 70 % y 100%, y más específicamente entre 80% y 100%, en comparación con los pozos de control positivo (es decir, el mismo anticuerpo anti-ActRIIB y ActRIIB, pero ningún anticuerpo de bloqueo cruzado de "prueba"). Los ejemplos de anticuerpos de bloqueo cruzado como se citan en la presente memoria son MOR08159 y MOR08213. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos que bloquean en forma cruzada MOR08159 o MOR08213 para la unión a ActRIIB.

#### Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención incluyen los anticuerpos recombinantes humanos, aislados y estructuralmente caracterizados, como se describe en los Ejemplos. Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  de los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se muestran en las SEQ ID NOs: 99-112. Las secuencias de aminoácidos de  $V_L$  de los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se muestran en las SEQ ID NOs: 85-98, respectivamente. Ejemplos de secuencias preferidas de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se muestran en las SEQ ID NOs: 146-150 y 156-160. Los ejemplos de secuencias preferidas de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa de anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se muestran en las SEQ ID NOs: 141-145 y 151-155, respectivamente. Otros anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos, pero tienen al menos 60, 70, 80, 90, 95, 97 o 99 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita más arriba.

Además, las secuencias de nucleótidos parentales de la cadena pesada variable se muestran en las SEQ ID NOs: 127-140. Las secuencias de nucleótidos parentales de la cadena ligera variable se muestran en las SEQ ID NOs: 113-126. Las secuencias de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero se muestran en las SEQ ID NOs: 161-165 y 171-175. Las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero se muestran en las SEQ ID NOs: 166-170 y 176-180. Otros anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención incluyen aminoácidos o están codificados por ácidos nucleicos que han sido mutados, pero tienen al menos 60 o más (es decir, 80, 90, 95, 97, 99 o más) por ciento de identidad con las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia divulgada más arriba.

Ya que cada uno de estos anticuerpos se une al mismo epítipo y son progenies del mismo anticuerpo parental, las secuencias de  $V_H$ ,  $V_L$ , de la cadena ligera de longitud completa y de la cadena pesada de longitud completa (secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de unión anti-ActRIIB de la invención. La unión de ActRIIB de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" se puede analizar usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando estas cadenas se mezclan y se emparejan, una secuencia de  $V_H$  de un emparejamiento  $V_H/V_L$  particular debe reemplazarse con una secuencia de  $V_H$  estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de la cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento particular de la cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debería reemplazarse por una secuencia de la cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de  $V_L$  de un emparejamiento de  $V_H/V_L$  particular debe reemplazarse con una secuencia de  $V_L$  estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de la cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento particular de la cadena pesada de

longitud completa/cadena ligera de longitud completa debería reemplazarse con una secuencia de la cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante o una región de unión a antígeno del mismo que tiene: una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 99-112; y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 85-98.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden:

(i) un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 99-112; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 85-98, o

(ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden:

(i) un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado que tiene una cadena pesada de longitud completa codificada por una secuencia de nucleótidos que se ha optimizado para la expresión en la célula de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 127-140, y una cadena ligera de longitud completa codificada por una secuencia de nucleótidos que se ha optimizado para la expresión en la célula de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 113-126, o

(ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de la misma.

Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de las CDR1 de  $V_H$  de los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se muestran en las SEQ ID NOs: 1-14. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de  $V_H$  de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 15-28. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de  $V_H$  de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 29-42. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de  $V_L$  de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 43-56. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de  $V_L$  de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 57-70. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de  $V_L$  de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 71-84. Las regiones CDR se delinean usando el sistema de Kabat (Kabat, E.A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242). Un método alternativo para determinar las regiones CDR usa el método ideado por Chothia (Chothia et al., 1989, Nature, 342: 877-883). La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural. Sin embargo, debido a los cambios en el sistema de numeración utilizado por Chothia (véase, por ejemplo, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html> y <http://www.bioinf.org.uk/abs/>), este sistema ahora se utiliza con menos frecuencia. Existen otros sistemas para definir CDR y también se mencionan en estos dos sitios web.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a ActRIIB y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de la CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y las secuencias de la CDR1, 2 y 3 de  $V_L$  pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y emparejarse, conteniendo cada anticuerpo una CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y una CDR1, 2 y 3 de  $V_L$  crean otras moléculas de unión anti-ActRIIB de la invención. La unión de ActRIIB de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" pueden probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias de la CDR de  $V_H$  se mezclan y emparejan, la secuencia de la CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> y/o CDR<sub>3</sub> de una secuencia de  $V_H$  particular debe reemplazarse por una secuencia o secuencias de la CDR estructuralmente similar. De la misma manera, cuando las secuencias de la CDR de  $V_L$  se mezclan y emparejan, la secuencia de la CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> y/o CDR<sub>3</sub> de una secuencia particular de  $V_L$  debe reemplazarse con una secuencia o secuencias de la CDR estructuralmente similar. Será evidente para un experto en la técnica que las secuencias novedosas de  $V_H$  y  $V_L$  pueden crearse sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de la CDR mostradas aquí para anticuerpos monoclonales.

El anticuerpo anti-ActRIIB comprendido en las composiciones de la invención, o la región de unión a antígeno del mismo tiene: una CDR1 de región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-14; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15-28; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 43-56; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 57-70; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 71-84.



ID NO: 26; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 40; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 54; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 68; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 82.

5 En una realización, el anticuerpo comprendido en la composición de la invención comprende: una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 13; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 27; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 41; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 55; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 69; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 83.

10 En una realización, el anticuerpo comprendido en la composición de la invención comprende: una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 28; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 42; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 56; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 70; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 84.

15 En una realización, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que comprende: (a) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 85 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 99; (b) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 86 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 100; (c) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 87 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 101; (d) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 88 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 102; (e) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 89 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 103; (f) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 90 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 104; (g) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 91 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 105; (h) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 92 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 106; (i) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 93 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 107; (j) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 94 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 108; (k) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 95 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 109; (l) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 96 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 110; (m) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 97 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 111; o (n) la secuencia de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 98 y la secuencia de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 112.

35 En una realización, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que comprende: (a) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 146 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 141; (b) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 147 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 142; (c) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 148 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 143; (d) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 149 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 144; (e) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 150 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 145; (f) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 156 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 151; (g) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 157 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 152; (h) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 158 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 153; (i) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 159 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 154; o (j) la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 160 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 155.

45 Como se usa en este documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera o cadenas pesada o ligera de longitud completa que son "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más próxima en secuencia (es decir, el % de identidad más elevado) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o introducción intencional de la mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias germinales de murino). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 80%, 90% o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos

a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

En una realización, el anticuerpo comprendido en las composiciones de la invención es el codificado por pBW522 o pBW524 (depositado en DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania el 18 de agosto de 2009 bajo los números de depósito DSM22873 y DSM22874, respectivamente).

#### 10 Anticuerpos homólogos

En aún otra realización, un anticuerpo comprendido en la composición de la invención tiene secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de longitud completa; secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y ligera de longitud completa, secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y ligera de región variable, o secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de región variable que son homólogas a las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, y en donde los anticuerpos retienen propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-ActRIIB de la invención.

Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo) que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en la que: la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 99-112; la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 85-98; alternativamente, las composiciones comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo) que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en la que: la región variable de la cadena pesada comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 aminoácidos o no más de 1 aminoácido que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 99-112; la región variable de la cadena ligera comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 o no más de 1 aminoácidos que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 85-98 y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la unión de miostatina *in vitro* o *in vivo*, (ii) disminuye la inhibición de la diferenciación muscular a través de la ruta dependiente de Smad y/o (iii) no induce cambios hematológicos, en particular, ningún cambio en RBC. En este contexto, el término "cambio" se refiere a inserciones, eliminaciones y/o sustituciones.

En un ejemplo adicional, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa, en la que: la cadena pesada de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 146-150 y 156 -160; la cadena ligera de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 141 -145 y 151-155; alternativamente, las composiciones comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo) que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en la que: la región variable de la cadena pesada comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 o no más de 1 aminoácidos que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 146-150 y 156 -160; la región variable de la cadena ligera comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 o no más de 1 aminoácidos que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 141-145 y 151-155 y el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la unión de miostatina *in vitro* o *in vivo*, (ii) disminuye la inhibición de la diferenciación muscular a través de la ruta dependiente de Smad y/o (iii) no induce cambios hematológicos, en particular, no cambios en RBC. Preferiblemente, dicho anticuerpo se une al dominio de unión a ligando de ActRIIB. En este contexto, el término "cambio" se refiere a inserciones, eliminaciones y/o sustituciones.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo), que comprende una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa, en la que: la cadena pesada de longitud completa está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que

consiste en las SEQ ID NOs: 166-170 y 176-180; la cadena ligera de longitud completa está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80%, o al menos 90% (preferiblemente al menos 95, 97 o 99%) idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 161 -165 y 171-175; alternativamente, las composiciones comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo) que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en la que: la región variable de la cadena pesada comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 o no más de 1 aminoácidos que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 166-170 y 176 -180; la región variable de la cadena ligera comprende no más de 5 aminoácidos, o no más de 4 aminoácidos, o no más de 3 aminoácidos, o no más de 2 o no más de 1 aminoácidos que cambian en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 161-165 y 171-175 y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la unión de miostatina *in vitro* o *in vivo*, (ii) disminuye la inhibición de la diferenciación muscular a través de la ruta dependiente de Smad y/o (iii) no induce cambios hematológicos, en particular, no cambios en RBC. Preferiblemente, dicho anticuerpo se une al dominio de unión a ligando de ActRIIB. En este contexto, el término "cambio" se refiere a inserciones, eliminaciones y/o sustituciones.

En diversas realizaciones, el anticuerpo comprendido en la composición de la invención puede exhibir una o más, dos o más, o tres de las propiedades funcionales discutidas anteriormente. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 completamente humano.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácido de VH y/o VL pueden ser 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias indicadas anteriormente. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas, excepto una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen una identidad elevada (es decir, 80% o superior) con las regiones VH y VL de las SEQ ID NO 99-112 y las SEQ ID NO: 85-98, respectivamente, puede obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, dirigida al sitio o mediada por PCR mutagénesis) de las moléculas de ácido nucleico SEQ ID NOs: 127-140 y 113-126 respectivamente, seguidas de la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida (es decir, las funciones indicadas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y/o de la cadena ligera de longitud completa pueden ser 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias indicadas anteriormente o pueden ser idénticas, excepto un cambio de aminoácido en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tiene una identidad alta (es decir, 80% o mayor) con las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de la SEQ ID NOs: 146-150 y 156-160 y cadenas ligeras de longitud completa de cualquier de las SEQ ID NOs: 141-145 y 151-155, respectivamente, pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 166-170 y 176-180 y SEQ ID NOs: 161-165 y 171-175, respectivamente, seguido de pruebas del anticuerpo alterado codificado para la función retenida (es decir, las funciones indicadas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En otras realizaciones, las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa pueden ser 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias establecidas anteriormente.

En otras realizaciones, las regiones variables de secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y/o cadena ligera pueden ser 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias indicadas anteriormente o pueden ser idénticas excepto un cambio de aminoácido en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos.

Como se usa en este documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17, 1988) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) , usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12 y una penalización por espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444 -453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso por espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprendido en la composición de la invención tiene una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de la CDR han especificado secuencias de aminoácidos basadas en los anticuerpos descritos en la presente memoria o secuencias variantes de los mismos que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-ActRIIB de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB recombinante aislado, o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3, en las que: las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-14 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15-28 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de las regiones variables de la cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 43-56 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de las regiones variables de la cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 57-70 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; las regiones variables de la cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de la CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 71-84 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos y modificaciones conservadoras de las mismas. Preferiblemente, el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la unión de miostatina *in vitro* o *in vivo*, (ii) disminuye la inhibición de la diferenciación muscular a través de la ruta dependiente de Smad y/o (iii) no induce cambios hematológicos, en particular, no hay cambios en RBC.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede exhibir una o ambas de las propiedades funcionales enumeradas anteriormente. Tales anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

En otras realizaciones, un anticuerpo comprendido en la composición de la invención optimizada para expresión en una célula de mamífero tiene una secuencia de la cadena pesada de longitud completa y una secuencia de la cadena ligera de longitud completa, en donde una o más de estas secuencias tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente memoria o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-ActRIIB de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-ActRIIB aislado optimizado para expresión en una célula de mamífero que consiste en una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en la que: la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de la SEQ ID NOs: 146-150 y 156-160 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOs: 141-145 y 151-155 o secuencias variantes de las mismas que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos, y modificaciones conservadoras de las mismas; y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: (i) inhibe la unión de miostatina *in vitro* o *in vivo*, (ii) disminuye la inhibición de la diferenciación muscular a través de la ruta dependiente de Smad y/o (iii) no induce cambios hematológicos, en particular, no cambios en RBC.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede exhibir una o ambas de las propiedades funcionales enumeradas anteriormente. Tales anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservadoras de secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en el arte, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina,

5 tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales, y el anticuerpo alterado puede analizarse por la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-ActRIIB comprendidos en la composición de la invención.

10 En otra realización, la invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los diversos anticuerpos anti-ActRIIB específicos descritos en la presente memoria. Todos los anticuerpos descritos en los ejemplos que son capaces de bloquear la unión de miostatina a ActRIIB se unen a uno de los epítopos en ActRIIB con alta afinidad, estando comprendido dicho epítipo entre los aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 181.

15 Por lo tanto, se pueden identificar anticuerpos adicionales basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la divulgación en ensayos de unión estándar de ActRIIB. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención a ActRIIB humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con dicho anticuerpo para unirse a ActRIIB humano; dicho anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al epítipo igual o relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente proximal) en ActRIIB humano como el anticuerpo con el que compite. En 20 una determinada realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en ActRIIB humano como los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención es un anticuerpo recombinante humano. Dichos anticuerpos recombinantes humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los ejemplos.

25 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por y/o que compite por la unión con un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 85, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 99.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 86, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 100.

30 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 87, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 101.

35 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 88, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 102.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 89, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 103.

40 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 90, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 104.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 91, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 105.

45 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 92, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 106.

50 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 93, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 107.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 94, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 108.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 95, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 109.

5 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 96, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 110.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 97, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 111.

10 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo reconocido por un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada variable indicada en la SEQ ID NO: 98, y la secuencia de la cadena ligera variable indicada en la SEQ ID NO: 112.

Después de experimentos más detallados de mapeo de epítipos, las regiones de unión de los anticuerpos preferidos de las composiciones de la invención se han definido más claramente.

15 Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 78-83 de la SEQ ID NO: 181 (WLDDFN - SEQ ID NO: 188).

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 76-84 de la SEQ ID NO: 181 (GCWLDDFNC - SEQ ID NO: 186).

20 La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 75-85 de la SEQ ID NO: 181 (KGCWLDDFNCY - SEQ ID NO: 190).

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 52-56 de la SEQ ID NO: 181 (EQDKR - SEQ ID NO: 189).

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 49-63 de la SEQ ID NO: 181 (CEGEQDKRLHCYASW - SEQ ID NO: 187).

25 La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o consiste en los aminoácidos 29-41 de la SEQ ID NO: 181 (CIYYNANWELERT-SEQ ID NO: 191).

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o consiste en los aminoácidos 100-110 de la SEQ ID NO: 181 (YFCCCEGNFCN - SEQ ID NO: 192); o

30 La invención también proporciona una composición que comprende anticuerpos que se unen a epítipos que consisten en estas secuencias o epítipos que comprenden combinaciones de estas regiones epitópicas.

Por lo tanto, la invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que comprende o consiste en los aminoácidos 78-83 de la SEQ ID NO: 181 (WLDDFN) y aminoácidos 52-56 de la SEQ ID NO: 181 (EQDKR).

#### Anticuerpos diseñados y modificados

35 Un anticuerpo comprendido en las composiciones de la invención adicionalmente puede prepararse usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  mostradas aquí como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse modificando residuos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

45 Un tipo de modificación de región variable que se puede realizar es el injerto de la CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de la CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de la CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332: 323 - 327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321: 522 - 525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 10029-10033; la patente de los Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

De acuerdo con esto, otra realización de la invención se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-ActRIIB, o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de la CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-14; secuencias de la CDR2  
 5 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15-28; secuencias de la CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42, respectivamente; y una región variable de la cadena ligera que tiene secuencias de la CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 43-56; secuencias de la CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 57-  
 10 70; y secuencias de la CDR3 que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 71-84, respectivamente. Por lo tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias de la CDR de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpos monoclonales, aunque pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea  
 15 germinal para genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias germinales humanas "VBase" (disponible en Internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat, EA, et al., [citado más arriba]; TomLinson, IM, et al., 1992 J. fol. Biol. 227: 776 - 798; y Cox, JPL et al., 1994 Eur. J Immunol. 24: 827-836. Un ejemplo de secuencias marco para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias estructurales utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias marco usadas por  
 20 los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de la CDR1, 2 y 3 de V<sub>H</sub>, y las secuencias de la CDR1, 2 y 3 de V<sub>L</sub>, pueden injertarse en regiones estructurales que tienen una secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que deriva la secuencia estructural, o pueden injertarse las secuencias de la CDR en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de  
 25 las regiones marco para mantener o mejorar la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del  
 30 anticuerpo de interés, conocido como "maduración de afinidad". La mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo u otras propiedades funcionales de interés puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe aquí y se proporciona en los Ejemplos. Se pueden introducir modificaciones conservadoras (como se discutió anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.  
 35

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-ActRIIB aislados, o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de la cadena pesada que tiene: una región CDR1 de V<sub>H</sub> que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 1-14 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 1-14; una región CDR2 de V<sub>H</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15-28, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 15-28; una región CDR3 de V<sub>H</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 29-42; una región CDR1 de V<sub>L</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 43-56, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 43-56; una región CDR2 de V<sub>L</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 52-70, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 52-70; y una región CDR3 de V<sub>L</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 71-84, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 71-84.  
 40  
 45  
 50

55 Injertar dominios de unión a antígeno en estructuras o andamios alternativos

Se puede emplear una amplia variedad de estructuras/andamios de anticuerpo/inmunoglobulina siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a ActRIIB. Dichos marcos o andamios incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos (tales como los descritos en otra parte de este documento), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, que preferiblemente tienen aspectos humanizados. Los anticuerpos de la cadena pesada sencilla, como los identificados en los camélidos, son de particular interés a este respecto. Nuevos marcos, andamios y fragmentos continúan siendo descubiertos y desarrollados por los expertos en la materia.  
 60

En un aspecto, las composiciones de la invención pueden comprender anticuerpos no basados en inmunoglobulinas usando andamios que no son de inmunoglobulina sobre los que pueden injertarse CDR de los anticuerpos divulgados. Se pueden emplear marcos y andamios que no son de inmunoglobulina conocidos o por conocer, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína objetivo de la SEQ ID NO: 181 (preferiblemente, el dominio de unión a ligando del mismo como se muestra en la SEQ ID NO: 182). Tales compuestos se conocen en la presente memoria como "polipéptidos que comprenden una región de unión específica del objetivo".

#### Modificación del marco o de Fc

Los anticuerpos modificados comprendidos en las composiciones de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en residuos de marco dentro de  $V_H$  y/o  $V_L$ , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "mutar nuevamente" uno o más residuos del marco a la secuencia correspondiente de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "mutarse nuevamente" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. Tales anticuerpos "mutados nuevamente" también pueden estar comprendidos en las composiciones de la invención.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en el documento US2003/0153043.

Además o alternativamente a las modificaciones hechas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden modificarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo comprendido en las composiciones de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más residuos químicos se pueden unir al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 5.677.425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión deteriorada de la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA del dominio de bisagra nativo de Fc. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.165.745. En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.277.375. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítomo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,869,046 y la patente de Estados Unidos No. 6,121,022.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se le altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 5.624.821 y la patente de Estados Unidos No. 5.648.260, ambos de Winter et al. En particular, los residuos 234 y 235 pueden estar mutados. En particular, estas mutaciones pueden ser por alanina. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprendido en las composiciones de la invención tiene una mutación en la región Fc en uno o ambos aminoácidos 234 y 235. En otra realización, uno o ambos aminoácidos 234 y 235 pueden estar sustituidos por alanina. La sustitución de ambos aminoácidos 234 y 235 por alanina da como resultado una actividad de ADCC reducida.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos de los anticuerpos descritos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo ha alterado la unión a C1q y/o reducido o suprimido la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.194.551.

- 5 En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos de los anticuerpos descritos se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO94/29351.

10 En otra realización más, la región Fc de los anticuerpos descritos se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento WO00/42072. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591-6604).

15 En otra realización más, la glicosilación de un anticuerpo comprendido en las composiciones de la invención se modifica. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos números 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

25 Adicional o alternativamente, puede usarse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las cuales expresar los anticuerpos recombinantes descritos para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al., describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se producen por expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. El documento WO03/035835 describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn (297), que también da como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, RL et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). El documento WO99/54342 describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosiltransferasas que modifican glucoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben estructuras de GlcNac bisectantes aumentadas que da como resultado una actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Alternativamente, los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención pueden producirse en una levadura o un hongo filamentosos diseñado para un patrón de glicosilación de tipo mamífero, y capaz de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

45 Otra modificación de los anticuerpos de la presente invención contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para formar derivados de otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo usado para pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos divulgados (véase, por ejemplo, los documentos EP0154316 y EP0401384).

60 Otra modificación de los anticuerpos contemplada por la invención es una conjugación o fusión proteica de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo comprendido en la composición de la invención a proteína sérica, tal como albúmina sérica humana o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante (véase, por ejemplo, el documento EP0322094). Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo comprendido en la composición de la invención a proteínas capaces de unirse a proteínas

séricas, tales como albúmina de suero humano para aumentar la semivida de la molécula resultante (véase, por ejemplo, el documento EP0486525).

Métodos de modificación de anticuerpos alterados

5 Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-ActRIIB que tienen secuencias de la CDR, secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> o secuencias de la cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas aquí se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti-ActRIIB modificando las secuencias de la CDR de las secuencias de cadena pesada y/o de cadena ligera de longitud completa, secuencias de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>, o la región o regiones constantes unidas a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-ActRIIB comprendido en las composiciones de la invención se usan para crear anticuerpos anti-ActRIIB estructuralmente  
10 relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención, tal como la unión a ActRIIB humano, pero también inhibe una o más propiedades funcionales de ActRIIB (por ejemplo, la inhibición de la activación de Smad).

Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la presente invención, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos adicionales anti-ActRIIB modificados en forma recombinante comprendidos en las composiciones de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación es una o más de las secuencias de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que  
15 tiene una o más de las secuencias de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Por el contrario, la información contenida en la secuencia o secuencias se utiliza como material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o secuencias originales y luego se prepara la secuencia o secuencias de "segunda generación" y se expresan como una proteína.

La secuencia de anticuerpo alterada también puede prepararse seleccionando bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias de la CDR3 fijadas seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-42 y las SEQ ID NOs: 71-84 o determinantes de unión esenciales mínimos como se describe en el documento US2005/0255552 y diversidad en secuencias de la CDR1 y CDR2. El cribado puede realizarse de acuerdo con cualquier tecnología de cribado apropiada para el cribado de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos, tal como la tecnología de presentación en fagos.  
25

Las técnicas de biología molecular estándar pueden usarse para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. El anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpos alterados es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-ActRIIB descritos en el presente documento, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no están limitadas a, unirse específicamente a ActRIIB humano y la inhibición de la activación de Smad.  
30

El anticuerpo alterado puede exhibir una o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales discutidas anteriormente.  
35

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA).

Las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente o selectivamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-ActRIIB y los anticuerpos anti-ActRIIB modificados resultantes pueden cribarse para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en este documento. Los métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, el documento WO02/092780 describe métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligación sintética o una combinación de los mismos. Alternativamente, el documento WO03/074679 describe métodos para  
40 usar métodos de cribado computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.  
45

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención

Se muestran ejemplos de secuencias de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero en las SEQ ID NOs: 161-165 y 171-175. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero se muestran en las SEQ ID NOs: 166-170 y 176-180.  
50

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., Ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular.  
55

Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante a continuación), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo preparado por el hibridoma se pueden obtener por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de varios clones de fagos que son miembros de la biblioteca. Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican segmentos de  $V_H$  y  $V_L$ , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica  $V_L$  o  $V_H$  se une operativamente a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco, o de modo que la proteína se expresa bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región  $V_H$  puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica  $V_H$  a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al., [citado más arriba]) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. La región constante de la cadena pesada se puede seleccionar entre isotipos de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica  $V_H$  se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región  $V_L$  se puede convertir a un gen de la cadena ligera completa (así como a un gen de la cadena ligera Fab) ligando operativamente el ADN que codifica  $V_L$  a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al., [citado más arriba]) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican  $V_H$  y  $V_L$  se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones  $V_L$  y  $V_H$  unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; Huston et al., 1988 Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348: 552- 554).

#### Generación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (1975 Nature 256: 495). Muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, las células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados comprendidos en las composiciones de la presente invención se pueden preparar en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y modificado para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino pueden insertarse en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

En una determinada realización, los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra ActRIIB pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcrómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcrómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en esta memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones Ig humanos".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene un miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y de cadena ligera  $\kappa$  humana no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena  $\mu$  y  $\kappa$  (véase por ejemplo, Lonberg, et al., 1994 Nature 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgGk monoclonal humana de alta afinidad. (Lonberg, N. et al., 1994 [citada más arriba]; revisada Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones del genoma llevadas a cabo por tales ratones, se describen con más detalle en Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94: 3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse además las patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; así como los documentos WO92/103918, WO93/12227, WO94/25585, WO97/113852, WO98/24884; WO99/45962; y WO01/14424.

En otra realización, los anticuerpos humanos comprendidos en las composiciones de la invención se pueden generar utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas tales como un ratón que porta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en la presente memoria "ratones KM", se describen en detalle en el documento WO02/43478.

Aún más, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ActRIIB de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.). Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.

Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ActRIIB de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 722-727. Además, las vacas que portan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humana se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20: 889-894) y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ActRIIB.

Los anticuerpos recombinantes humanos comprendidos en las composiciones de la invención también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908; 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

Los anticuerpos monoclonales humanos comprendidos en las composiciones de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los que las células inmunes humanas se han reconstituido de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.476.996 y 5.698.767.

#### 45 Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos comprendidos en las composiciones de la invención, los esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados se pueden aislar y fusionar a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se pueden fusionar a un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras de P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50% de PEG. Las células se siembran en placa a aproximadamente 2 x 145 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 20% de suero de clonación fetal, 18% de medios condicionados "653", 5% de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, Piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomina, 50 mg/mL de gentamicina y HAT 1X (Sigma; el HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que el HAT se reemplaza por HT. Los pozos individuales pueden luego cribarse mediante ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce un crecimiento extenso del hibridoma, se puede observar el medio por lo general después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden sembrar en placa nuevamente, cribar de nuevo, y si

todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden luego cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo tisular para su caracterización.

5 Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, se pueden hacer crecer hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia). La IgG eluida puede controlarse mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse en PBS y la concentración puede determinarse mediante  $DO_{280}$  utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Se pueden tomar alícuotas de anticuerpos monoclonales y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 10 Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

15 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación de PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden insertar en vectores de expresión de manera que los genes se unan operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, el término "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligamiento del extremo romo si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos aquí pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y constante de la cadena ligera del isotipo deseado de modo que el segmento  $V_H$  está operativamente enlazado al segmento o segmentos CH dentro del vector y el segmento  $V_L$  está operativamente enlazado al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se une en el marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus 40 de simio (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de P-globina. Aún además, elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al., 1988). Mol. Cell. Biol. 8: 466-472).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que

codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariontas o eucariotas. La expresión de anticuerpos en células eucariotas, en particular células huésped de mamífero, se discute porque tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, son más propensas que las células procariontas a ensamblar y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y plegado adecuadamente. Se ha informado que la expresión procarionta de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M.A. y Wood, C. R., 1985 *Immunology Today* 6: 12-13).

Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes comprendidos en las composiciones de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 4216-4220 usado con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo como se describe en RJ Kaufman y PA Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En una realización, las células huésped son células CHO K1PD. En particular, para el uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen GS mostrado en los documentos WO87/04462, WO89/01036 y EP 338.841. Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes comprendidos en las composiciones de la invención incluyen líneas celulares de mamífero deficientes para la expresión del gen FUT8, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.946.292 B2. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células huésped crecen. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

#### 25 Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta composiciones que comprenden un anticuerpo anti-ActRIIB, o un fragmento del mismo, conjugado con un residuo terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan aquí "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las mata).

Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que es, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. et al., *Adv. 2003. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. et al., 2003 *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328 - 337; Payne, G. 2003 *Cancer Cell* 3: 207 - 212; Allen, T.M., 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2: 750 - 763; Pastan, I. y Kreitman, R. J., 2002 *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J., 2001 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264.

Los anticuerpos comprendidos en las composiciones de la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutecio<sup>177</sup>. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles en el mercado, incluidos Zevalin<sup>MR</sup> (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar<sup>MR</sup> (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpos comprendidos en las composiciones de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el residuo de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- $\gamma$ ; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicho residuo terapéutico con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer*

Therapy, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2a Ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

#### Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de los anticuerpos/anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, o una porción o porciones de unión a antígeno de los mismos, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) los anticuerpos descritos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-ActRIIB de la presente invención combinado con al menos otro agente que aumenta la masa muscular/fuerza, por ejemplo, IGF-1, IGF-2 o variantes de IGF-1 o IGF-2, un anticuerpo antimiotostatina, un propéptido de miostatina, una proteína señuelo de miostatina que se une a ActRIIB pero no lo activa, un agonista beta 2, un agonista de Ghrelin, un SARM, agonistas/miméticos de GH o folistatina. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, se puede recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, SM, et al., 1977 *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanólicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, citados más arriba, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las

composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

10 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede realizar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de agentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros agentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del agente activo más cualquier agente deseado adicional de una solución previamente esterilizada del mismo.

25 La cantidad de agente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y del modo particular de administración. La cantidad de agente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de agente activo, de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, o de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de agente activo. en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que debe lograrse, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

35 Para la administración la composición que comprende el anticuerpo, la dosificación del anticuerpo varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 30 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de aproximadamente 0,3 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 30 mg/kg peso corporal dentro de los intervalos de aproximadamente 1-10 mg/kg o aproximadamente 3-7 mg/kg. Un ejemplo de un régimen de tratamiento implica administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse aproximadamente una vez al año o una sola vez. Dicha administración puede llevarse a cabo por vía intravenosa o subcutánea. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-ActRIIB de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes esquemas de dosificación: cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

La dosificación debería ser una que provoque un aumento del BAT sin aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión están comprendidos en las composiciones de la invención y, por lo tanto, se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo generalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses, cada seis meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpos contra el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1.000 µg/mL y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/mL. Por ejemplo, un anticuerpo ActRIIB de la invención podría administrarse conjuntamente con un anticuerpo antimiotostatina.

Alternativamente, la composición puede ser una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza o hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los agentes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del agente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y factores bien conocidos en las artes médicas.

La administración de una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-ActRIIB comprendido en las composiciones de la invención puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad, es decir, un aumento en la masa muscular y/o la fuerza.

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración para anticuerpos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en este documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación inyección e infusión, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. En una realización, la composición que comprende el anticuerpo se administra por vía intravenosa. En otra realización, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. Alternativamente, un anticuerpo que comprende la composición de la invención puede administrarse por una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las patentes de los Estados Unidos Nos 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: la patente de los Estados Unidos No. 4.487.603, que muestra una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; la patente de los Estados Unidos No. 4.486.194, que muestra un dispositivo terapéutico para administrar

medicamentos a través de la piel; la patente de los Estados Unidos No. 4.447.233, que muestra una bomba de infusión de medicamentos para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de los Estados Unidos No. 4.447.224, que muestra un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de los Estados Unidos No. 4.439.196, que muestra un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de los Estados Unidos No. 4.475.196, que muestra un sistema osmótico de suministro de fármaco. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen los fabricados por MicroCHIPS<sup>MR</sup> (Bedford, MA).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos que comprenden la composición de la invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más residuos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol., 29: 685). Los ejemplos de residuos de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.416.016); manosidasa (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chernother., 39: 180); un receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233: 134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4: 273.

#### Usos y métodos de la invención

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-ActRIIB como se define en las presentes reivindicaciones en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico, particularmente obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, lipodistrofia, tolerancia alterada a la glucosa, concentraciones elevadas de insulina en plasma, resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular o problemas respiratorios o para disminuir la concentración promedio de glucosa en plasma, controlar la homeostasis de la glucosa o la sensibilidad a la insulina.

Los métodos son particularmente adecuados para tratar, prevenir o mejorar trastornos metabólicos.

La divulgación también se refiere a los métodos para tratar a un sujeto que padece un trastorno metabólico y una enfermedad o trastorno musculoesquelético, tal como atrofia muscular. La atrofia muscular puede ser sarcopenia asociada a la obesidad, sarcopenia o atrofia muscular asociada a la diabetes.

Existen muchas causas de atrofia muscular, incluso como resultado del tratamiento con un glucocorticoide como cortisol, dexametasona, betametasona, prednisona, metilprednisolona o prednisolona. La atrofia muscular también puede ser el resultado de una denervación debida a un traumatismo nervioso o un resultado de neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (por ejemplo, síndrome de Guillian-Barré, neuropatía periférica o exposición a toxinas o fármacos ambientales). Además, la atrofia muscular puede ser un resultado de miopatía, tal como la miotonía; una miopatía congénita, que incluye miopatía nemalínica, miopatía multi/minicore y miopatía miotubular (centronuclear); miopatía mitocondrial; parálisis periódica familiar; miopatía inflamatoria; miopatía metabólica, tal como la causada por una enfermedad de almacenamiento de glucógeno o lípidos; dermatomiositis; polimiositis; miositis por cuerpos de inclusión; miositis osificante; rabdomiólisis y mioglobinurias. Otras afecciones que conducen a enfermedades musculoesqueléticas o atrofia muscular se describieron en detalle anteriormente. Los resultados del tratamiento pueden ser completos, por ejemplo, la ausencia total de un trastorno metabólico. Los resultados también pueden ser parciales, de manera que la peculiaridad del trastorno metabólico en un sujeto es estadísticamente significativamente menos pronunciada que si el sujeto no hubiera recibido una composición de la presente invención. Los resultados parciales del tratamiento pueden ser una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la discapacidad debido a la enfermedad. Una afección relacionada con la edad como se menciona en este documento puede comenzar a la edad de 50 años o más (es decir, 60, 70, 80 o más).

En una realización, un paciente puede tratarse previamente con un anticuerpo anti-ActRIIB o una composición de acuerdo con las presentes reivindicaciones antes de un período anticipado de descanso/inactividad forzada. Tal período puede ocurrir cuando un paciente ingresa en un hospital, por ejemplo para una cirugía en la cadera o la pierna. La inactividad puede estar localizada, por ejemplo, al enyesar una extremidad o articulación rota, o por la administración de un agente paralizante.

En una realización adicional, el paciente puede ser uno que no ha respondido a tratamientos previos. Por ejemplo, el paciente puede no haber respondido al tratamiento con IGF-1, IGF-2 o variantes de IGF-1 o IGF-2, un anticuerpo antimiostatina, un propéptido de miostatina, una proteína señuelo de miostatina que se une a ActRIIB pero no lo activa, un agonista beta 2, un agonista de Ghrelin, un SARM, agonistas/miméticos de GH o folistatina. Una manera

simple de medir la respuesta de un paciente al tratamiento puede ser cronometrar el tiempo que le toma a un paciente subir una altura conocida de las escaleras y comparar los resultados antes y después del tratamiento.

5 Los anticuerpos ActRIIB se pueden administrar como el único agente activo o junto con, por ejemplo, un adyuvante para, o en combinación con, otros medicamentos, por ejemplo, IGF-1, IGF-2 o variantes de IGF-1 o IGF-2, un anticuerpo antimiostatina, un propéptido de miostatina, una proteína señuelo de miostatina que se une a ActRIIB pero no lo activa, un agonista beta 2, un agonista de Ghrelin, un SARM, agonistas/miméticos de GH o folistatina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con un mimético de IGF-1 como se divulga en el documento WO2007/146689.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un aspecto incluso adicional:

10 Un método o uso como se definió anteriormente que comprende la administración conjunta, por ejemplo de forma concomitante o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo ActRIIB y al menos una segunda sustancia farmacológica, siendo dicha segunda sustancia farmacológica IGF-1, IGF-2 o variantes de IGF-1 o IGF-2, un anticuerpo antimiostatina, un propéptido de miostatina, una proteína señuelo de miostatina que se une a ActRIIB pero no lo activa, un agonista de beta 2, un agonista de Ghrelin, un SARM, agonistas/miméticos de GH o folistatina.

15

Secuencias

Tabla 1: listado de secuencias

SEQ ID NO	Región de Ab	Secuencia
SEQ ID NO 1	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 2	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 3	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 4	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 5	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 6	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 7	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 8	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 9	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO 10	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO11	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO12	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO13	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO14	HCDR1	GYTFTSSYIN
SEQ ID NO15	HCDR2	TINPVSGNTSYAQKFQG
SEQ ID NO16	HCDR2	TINPVSGNTSYAQKFQG
SEQ ID NO17	HCDR2	TINPVSGNTSYAQKFQG
SEQ ID NO18	HCDR2	TINPVSGNTSYAQKFQG
SEQ ID NO19	HCDR2	MINAPIGTTRYAQKFQG
SEQ ID NO20	HCDR2	QINAASGMTRYAQKFQG
SEQ ID NO21	HCDR2	MINAPIGTTRYAQKFQG

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO22	HCDR2	TINPVSGNTRYAQKFQG
SEQ ID NO23	HCDR2	TINPVSGSTSYAQKFQG
SEQ ID NO24	HCDR2	QINAASGMTRYAQKFQG
SEQ ID NO25	HCDR2	NINAAAAGITLYAQKFQG
SEQ ID NO26	HCDR2	TINPPTGGTYAQKFQG
SEQ ID NO27	HCDR2	GINPPAGTTSYAQKFQG
SEQ ID NO28	HCDR2	NINPATGHADY AQKFQG
SEQ ID NO29	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO30	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO31	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO32	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO33	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO34	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO35	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO36	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO37	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO38	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO39	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO40	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO41	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO42	HCDR3	GGWFDY
SEQ ID NO43	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO44	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO45	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO46	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO47	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO48	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO49	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO50	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO51	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO52	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO53	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO54	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO55	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO56	LCDR1	TGTSSDVGSYNYVN
SEQ ID NO57	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO58	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO59	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO60	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO61	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO62	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO63	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO64	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO65	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO66	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO67	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO68	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO69	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO70	LDCR2	LMIYGVSKRPS
SEQ ID NO71	LCDR3	QAWTSKMAG
SEQ ID NO72	LCDR3	SSYTRMGHP
SEQ ID NO73	LCDR3	ATYGKGVTPP
SEQ ID NO74	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO75	LCDR3	QAWTSKMAG
SEQ ID NO76	LCDR3	QAWTSKMAG
SEQ ID NO77	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO78	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 79	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 80	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 81	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 82	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 83	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 84	LCDR3	GTFAGGSYYG
SEQ ID NO 85	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQAWTSKMAGVFGGGTKLTVLGG

ES 2 692 519 T3

EQ ID NO 86	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 87	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCATYKGVTPPVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 88	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 89	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQAWTSKMAGVFGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 90	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQAWTSKMAGVFGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 91	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 92	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 93	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 94	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 95	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 96	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 97	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 98	VL	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFVGGGKTLTVLGG
SEQ ID NO 99	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGNT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 100	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGNT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 101	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGNT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 102	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGNT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 103	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGMINAPIGTR YAKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 104	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGQINAASGMT RYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 105	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGMINAPIGTR YAKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS
SEQ ID NO 106	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGNT RYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFDYWGQGLTIVVSS

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 107	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGST SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 108	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGQINAASGMT RYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 109	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGNINAAAGITL YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 110	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPPTGGT YYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 111	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGGINPPAGTT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 112	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGNINPATGHA DYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 113	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGGAAGGCCGCCGAAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTGGACTTCT AAGATGGCTGGTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 114	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGGAAGGCCGCCGAAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATACTCGTA TGGGTATCCTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 115	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGGAAGGCCGCCGAAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGCTACTTATGGTAAG GGTGTACTCCTCCTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 116	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGGAAGGCCGCCGAAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGTACTTTTGTGGT GGTTCTTATATGGTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 117	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGGAAGGCCGCCGAAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTGGACTTCT AAGATGGCTGGTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 118	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTGACTTCT AAGATGGCTGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 119	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 120	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 121	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 122	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 123	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACC AGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG
SEQ ID NO 124	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGTGTACTGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTACCA GCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCCTC AGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCAT TAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGTGG TTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 125	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTTAAGCGTCCCT AGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCTTGCCAG
SEQ ID NO 126	ADN VL	GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACC ATCTCGGTACGGGTAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTTAAGCGTCCCT AGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTTAAGCGTCCCT CAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACC ATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGGT GGTTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCTTGCCAG
SEQ ID NO 127	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGTTTTCTGGCAATA CGTCTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 128	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGTTTTCTGGCAATA CGTCTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 129	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGTTTTCTGGCAATA CGTCTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 130	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGTTTTCTGGCAATA CGTCTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 131	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGTTTTCTGGCAATA CTCGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCCGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 132	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCCAGATTAATGCTGCTTCTGGTATGA CTCGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 133	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATGATTAATGCTCCTATTGGTACTA CTCGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 134	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGGTTTCTGGCAATA CGCGTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 135	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATCAATCCGGTTTCTGGCTCTA CGTCTTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 136	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCCAGATTAATGCTGCTTCTGGTATGA CTCGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 137	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATTAATGCTGCTGCTGGTATTA CTCTTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCATGACCCGTGATACCAGCATTAG CACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTG CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT A

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 138	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCACTATTAATCCTCCTACTGGAGGTA CTTATTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAG CACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTG CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC A
SEQ ID NO 139	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATTAATCCTCCTGCTGGTACTA CTTCTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCATGACCCGTGATACCAGCATTAG CACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTG CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC A
SEQ ID NO 140	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTCTTATTAATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATTAATCCTGCTACTGGTCATG CTGATTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAG GCACCGCGTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT CA
SEQ ID NO 141	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 142	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 143	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 144	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 145	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 146	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGST SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGWFYDYGQGLTQVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 147	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGQINAASGMT RYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGWFYDYGQGLTQVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 148	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGNINAAAGITL YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGWFYDYGQGLTQVTVSSAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 149	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGGINPPAGTT SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGWFYDYGQGLTQVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 150	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGNINPATGHA DYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGWFYDYGQGLTQVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 151	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGTKLTVLQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 152	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 153	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 154	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 155	Cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGKTLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 156	Cadena ligera	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGTINPVSGST SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSG LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSIVTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 157	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGQINAAAGMT RYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSG LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSIVTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO 158	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGNINAAAGITL YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDAVYYCARGGWFYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGL YSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 159	Cadena pesada	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGINPPAGTT          SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGGWFYDWGQGLTVTVSSA          STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSG          LYSLSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFL          FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR          VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN          QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG          NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO 160	Cadena pesada	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSYINWVRQAPGQGLEWMGINPATGHA          DYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGGWFYDWGQGLTVTVSSA          STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSG          LYSLSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFL          FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR          VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN          QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG          NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO 161	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCAGGCCAGTCTATCAC          AATCAGCTGCACCGGCACCTCCAGCGACGTGGGCAGCTACAACACTCGTGAAGTGGTA          TCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGGCGTGAGCAAGAGGC          CCAGCGGCGTGTCCAACAGGTTTCCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTG          ACAATCAGTGGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGGCACCTTTGC          CGGCGGATCATACTACGGCGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTGCTGGGCC          AGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG          GCCAACAAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC          CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC          CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCC          CGAGCAGTGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA          CCGTGGAAGAACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC</p>
SEQ ID NO 162	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCAGGCCAGTCTATCAC          AATCAGCTGCACCGGCACCTCCAGCGACGTGGGCAGCTACAACACTCGTGAAGTGGTA          TCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGGCGTGAGCAAGAGGC          CCAGCGGCGTGTCCAACAGGTTTCCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTG          ACAATCAGTGGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGGCACCTTTGC          CGGCGGATCATACTACGGCGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTGCTGGGCC          AGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG          GCCAACAAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC          CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC          CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCC          CGAGCAGTGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA          CCGTGGAAGAACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC</p>

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 163	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCAGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC  CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO 164	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCAGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC</p>
		<p>CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO 165	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCAGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC  CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>

<p>SEQ ID NO 166</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAA  GGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCAGCTACATCAACTGGGTCCG  CCAGGCTCCTGGGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCACCATCAACCCCGTGTCCGGCA  GCACCAGCTACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACCAGC  ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGGCTGAGAAGCGACGACACCCGCGTGA  CTACTGCGCCAGGGGCGGCTGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG  TGTCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAG  AGCACCTCCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA  GCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC  AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC  ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCC  CCCCTGCCAGCCCCCGAAGCTGCAGGCGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCA  AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG  GACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  GGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGG  TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGT  GCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCA  AGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCTCGGGAGGAGATG  ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATC  GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCC  AGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAG  CAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA  ACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCACCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO 167</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAA  GGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCAGCTACATCAACTGGGTCCG  CCAGGCTCCAGGGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCCAGATCAACGCCGCCAGCGGC  ATGACCAGATACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACAATGACCAGGGACACCTCT  ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGGCTGAGAAGCGACGACACCCGCGTGA  CTACTGCGCCAGGGGCGGCTGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG  TGTCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAG  AGCACCTCCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA  GCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC  AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC  ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCC  CCCCTGCCAGCCCCCGAAGCTGCAGGCGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCA  AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG  GACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  GGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGG  TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGT  GCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCA  AGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCTCGGGAGGAGATG  ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATC  GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCC  AGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAG  CAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA  ACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCACCCGGCAAG</p>

<p>SEQ ID NO 168</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA  AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCCGCC  AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTAATGCTGCTGCTGGTATTA  CTCTTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCCATGACCCGTGATACCAGCATTAG  CACCGCGTATATGGAAGTGAAGTCCGCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGTATTATTG  CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC  AGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC  TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA  CGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC  CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC  TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCA  GCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGA  CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC  ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC  CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC  AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC  CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA  GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG  GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT  CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC  AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
<p>SEQ ID NO 169</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA  AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCCGCC  AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATTAATCCTCCTGCTGGTACTA  CTTCTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCCATGACCCGTGATACCAGCATTAG  CACCGCGTATATGGAAGTGAAGTCCGCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGTATTATTG  CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC  AGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC  TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA  CGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC  CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC  TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCA  GCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGA  CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC  ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC  CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC  AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC  CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA  GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG  GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT  CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC  AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>

<p>SEQ ID NO 170</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGGAGCGTGAA                  AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCCGCC                  AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTAATCCTGCTACTGGTCATG                  CTGATTATGCTCAGAAAGTTTCAGGGTCCGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT                  GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCCGCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGATTATT                  GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT                  CAGCCTCCACCAAGGTCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCTCCTCAAGAGCACCT                  CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTG                  ACGGTGTCGTGGAAGTCTGAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT                  CCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG                  CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT                  GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC                  AGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGA                  CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCC                  ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG                  CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC                  CTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC                  AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC                  CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA                  GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG                  GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT                  CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC                  AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC                  AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
<p>SEQ ID NO 171</p>	<p>Cadena ligera de ADN</p>	<p>CAGAGCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCCAGGCCAGTCTATCAC                  AATCAGCTGCACCGGCACCTCCAGCGACGTGGGCAGCTACAACACTACGTGAAGTGGTA                  TCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGGCGTGAGCAAGAGGC                  CCAGCGGCGTGTCCAACAGGTTAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTG                  ACAATCAGTGGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGGCACCTTTGC                  CGGCGGATCATACTACGGCGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTGTGGGCC                  AGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG                  GCCAAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC                  CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC                  CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCC                  CGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA                  CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC</p>
<p>SEQ ID NO 172</p>	<p>Cadena ligera de ADN</p>	<p>CAGAGCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCCAGGCCAGTCTATCAC                  AATCAGCTGCACCGGCACCTCCAGCGACGTGGGCAGCTACAACACTACGTGAAGTGGTA                  TCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGGCGTGAGCAAGAGGC                  CCAGCGGCGTGTCCAACAGGTTAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTG                  ACAATCAGTGGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGGCACCTTTGC                  CGGCGGATCATACTACGGCGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTGTGGGCC                  AGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG                  GCCAAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC                  CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC                  CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCC                  CGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA                  CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC</p>

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 173	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTTCCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC  CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO 174	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTTCCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC  CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO 175	Cadena ligera de ADN	<p>CAGAGCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTAC  CATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTTCTTATAATTATGTGAATTGGTAC  CAGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGGTGTTCCTAAGCGTCCC  TCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGAC  CATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCGGTACTTTTGCTGG  TGGTTCCTTATTATGGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCC  CAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA  CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC  CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCTCCA  AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>

<p>SEQ ID NO 176</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAA  GGTGTCTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCAGCTACATCAACTGGGTCCG  CCAGGCTCCTGGGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCACCATCAACCCCGTGTCCGGCA  GCACCAGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACCAGC  ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGGCTGAGAAGCGACGACACCCGCCGTGTA  CTACTGCGCCAGGGGCGGCTGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG  TGTCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCGTGGCCCCCTGCAGCAGA  AGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA  GCCAGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCC  AGCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAAC  ACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGAGGAAGTGTCTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCC  AGCCCCCAGTGGCCGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAGCCCAAGCCAAAGGACA  CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAC  GAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC  CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAAACAGCACCTTACAGGTGGTGTCCGTGCT  GACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA  ACAAGGGCCTGCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCA  CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCA  GGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  GGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGAC  AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  GCAGGGCAACGTGTTTCACTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA  CCGAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO 177</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAA  GGTGTCTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCAGCTACATCAACTGGGTGCG  CCAGGCTCCAGGGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCCAGATCAACGCCGCCAGCGGC  ATGACCAGATACGCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACAATGACCAGGGACACCTCT  ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGGCTGAGAAGCGACGACACCCGCCGTGTA  CTACTGCGCCAGGGGCGGCTGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG  TGTCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCGTGGCCCCCTGCAGCAGA  AGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA  GCCAGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCC  AGCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAAC  ACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGAGGAAGTGTCTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCC  AGCCCCCAGTGGCCGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAGCCCAAGCCAAAGGACA  CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAC</p>
		<p>GAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC  CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAAACAGCACCTTACAGGTGGTGTCCGTGCT  GACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA  ACAAGGGCCTGCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCA  CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCA  GGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  GGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGAC  AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  GCAGGGCAACGTGTTTCACTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA  CCGAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGCAAG</p>

<p>SEQ ID NO 178</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA  AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCCGCC  AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATTAATGCTGCTGCTGGTATTA  CTCTTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCCATGACCCGTGATACCAGCATTAG  CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCGCCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGATTATTG  CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC  AGCTTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCA  GCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG  ACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGT  GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCA  ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG  TGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCCCTGCCCT  CCTGTGGCCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG  ATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC  CGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA  AGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG  GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGG  CCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACAAAGGGCCAGCCAGGGAAC  CCCAGGTGTACACCCTGCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCC  CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG  CAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACAGCGACG  GCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC  AACGTGTTGAGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG  AGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAA</p>
<p>SEQ ID NO 179</p>	<p>Cadena pesada de ADN</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA  AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCCGCC  AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATTAATCCTCCTGCTGGTACTA  CTTCTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTACCCATGACCCGTGATACCAGCATTAG  CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCGCCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGATTATTG  CGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC  AGCTTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCA  GCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG  ACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGT  GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCA  ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG  TGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCCCTGCCCT  CCTGTGGCCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG  ATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC  CGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA  AGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG</p>
		<p>GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGG  CCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACAAAGGGCCAGCCAGGGAAC  CCCAGGTGTACACCCTGCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCC  CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG  CAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACAGCGACG  GCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGC  AACGTGTTGAGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG  AGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAA</p>

ES 2 692 519 T3

SEQ ID NO 180	Cadena pesada de ADN	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGGCGGGAAGTGAAAAACCGGGCGGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTTCTTATATTAATTGGGTCGGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTAATCCTGCTACTGGTCATG CTGATTATGCTCAGAAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATT GCACCGCGTATATGGAAGTCTGAGCCGCTGCGTAGCGATGATACGGCCGTGATTATT GCGCGCGTGGTGGTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCT CAGCTTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACC AGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCGAGCAGC AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCCCTGCCCT TCCTGTGGCCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCGTGAT GATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGGTGCACACGAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG GCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACAAAGGGCCAGCCAGGGAA CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTACCCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACAGCGAC GGCAGTTCCTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGTGACAGGAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAA
SEQ ID NO 181	ActRIIB	MTAPWVALALLWGS L CAGS RGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL PEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDVFVAVKIFLQDKQSQSREIFSTP GMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETMSRGL SYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFLAVRFEPGKPPGDTHG QVGTRRYMAPEVLEGAINFORDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEACWDHDAEARLSAGCVVEE RVSLIRRSVNGTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESI
SEQ ID NO 182	Dominio de unión al ligando de ActRIIB (aa19-134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGC WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
SEQ ID NO 183	Región de unión al anticuerpo	IELVKKGSWLDDFNS
SEQ ID NO 184	Región de unión al anticuerpo	VKKGSWLDDFNSYDR
SEQ ID NO 185	Región de unión al anticuerpo	GSWLDDFNSYDRQES
SEQ ID NO 186	Región de unión al anticuerpo	GCWLDDFNC
SEQ ID NO 187	Región de unión al anticuerpo	CEGEQDKRLH CYASW

SEQ ID NO 188	Región de unión al anticuerpo	WLDDFN
SEQ ID NO 189	Región de unión al anticuerpo	EQDKR
SEQ ID NO 190	Región de unión al anticuerpo	KGCWLDDFNCY
SEQ ID NO 191	Región de unión a anticuerpo	CIYYNANWELERT
SEQ ID NO 192	Región de unión a anticuerpo	YFCCCEGNFCN
SEQ ID NO 193	Cadena h/mLgG2 aLALA-ligera	DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVNWYQQHPGKAPKLMYGVSKRPSGV SNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGTFAGGSYYGVFGGGTKLTVLGGPKSTPTL TVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPTQGVDTSNPTKEGNKFMAS FLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPAACL
SEQ ID NO 194	Cadena h/mlgG2 aLALA-pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFT SSYINWVRQAPGGLEWM GTINPVSGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWFYDWGQ GTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNAAGGSPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMWGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVSRAQVYVL PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSVVEHGLHNHHTTKSFSRTPGK

La invención que se ha descrito completamente se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que son ilustrativos y no pretenden ser limitantes adicionales.

**Ejemplos**

5 Metodología general

Anticuerpos ActRIIB, su caracterización y métodos relacionados con los mismos como (i) Ensayos funcionales, (ii) ensayos de genes informadores (RGA), (iii) Cultivo de líneas celulares HEK293T/17, (iv) Ensayos de genes reporteros de luciferasa inducidos por miostatina, (v) ELISA de especificidad, (vi) ELISA de interacción de la unión a ActRIIB/Fc-miostatina, (vii) valoración para FACS en células que expresan hActRIIB y hActRIIA, (viii) Unión a células primarias de músculo esquelético humano, (ix) determinación de afinidad de Fab del ActRIIB antihumano utilizando resonancia de plasmón superficial (Biacore), (x) ensayo CK, (xi) modelos animales, (xii) protocolos de tratamiento, (xiii) análisis Estadístico, (xiv) paneos, (xv) identificación y caracterización de anticuerpos, (xvi) optimización de anticuerpos derivados de la primera maduración de afinidad, (xvii) conversión de IgG2 de Fab madurados por afinidad (1ra maduración), (xviii) segunda maduración de afinidad, (xix) conversión de IgG2 y caracterización de IgG2 (2da maduración), (xx) Caracterización de anticuerpos anti-ActRIIB en estudios murinos *in vivo*, (xxi) confirmación de afinidad por SET, (xxii) estudios de bloqueo cruzado y (xxiii) los detalles y las tecnologías de mapeo de epítopos se han divulgado en el documento WO 2010/125003.

**Ejemplos de trabajo:** biología molecular

20 Diferenciación de adipocito marrón. Se aislaron preadipocitos marrón primarios a partir de tejido adiposo marrón interescapular de ratones C57BL6/J macho de 5 semanas de edad usando disociación con colagenasa como se describió previamente (Feige, et al., 2008). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma), insulina 3 nM (Sigma) y un cóctel de antibióticos (Invitrogen). Después de alcanzar la confluencia, se diferenciaron los preadipocitos marrón en placas de 25 pozos durante 9 días con insulina 20 nM y triyodo-tironina 1 nM (T3; Sigma) para el protocolo completo y IBMX 0,5 mM (Sigma), dexametasona 0,5 µM (Sigma) y indometacina 0,125 mM (Sigma) durante los primeros dos días. El medio y los tratamientos fueron reemplazados cada 2 días.

Experimentos con animales. Los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con la ordenanza suiza sobre experimentación con animales después de la aprobación por parte de las autoridades veterinarias cantonales. Ratones macho C57Bl6/J de diez semanas de edad (Laboratorios Janvier, Francia) o ratones hembra CB17/ICR-

*Prkdc<sup>scid</sup>/Crl* (ratones Scid, Charles River, Alemania) se mantuvieron a 22°C en un ciclo de luz- oscuridad de 12 horas con acceso irrestricto a dieta y al agua regulares. Los animales se trataron con los anticuerpos durante cuatro semanas mediante inyección subcutánea semanal con un volumen de 5 mL/kg y una dosis de 20 mg/kg, a menos que se indique lo contrario. La tolerancia al frío se evaluó colocando animales durante 4 horas a 10°C en jaulas individuales y midiendo la temperatura corporal cada hora con un termómetro rectal (Bioseb). Todos los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y los animales expuestos a frío se sacrificaron inmediatamente después de la exposición al frío durante 24 h.

Perfilado de expresión génica. El ARN se extrae usando reactivo Trizol (Invitrogen). La transcripción inversa se realizó con hexámeros aleatorios en 1 µg de ARN total usando un kit de transcripción inversa de alta capacidad (Applied Biosystems) y la reacción se diluyó 100 veces para amplificación. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en placas de 384 pozos en un ciclador CFX384 (BioRad) usando sondas TaqMan específicas (Applied Biosystems). Los datos se normalizaron con uno o dos genes de mantenimiento usando el método  $\Delta\Delta Ct$ .

Perfilado hematológico en primates no humanos. Se administró MOR08159 una vez a la semana durante 3 meses a monos cynomolgus macho y hembra mediante inyección intravenosa. Se asignaron 32 monos cynomolgus (16/sexo) a uno de cuatro grupos de tratamiento (3 a 5 animales/sexo/grupo) y se les administraron inyecciones intravenosas de cada vehículo o MOR08159 a razón de 10, 30 o 100 mg/kg una vez por semana durante 13 semanas (total de 14 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron patología clínica general (hematología, química clínica y coagulación). MOR08159 no causó cambios hematológicos significativos a lo largo del estudio en glóbulos rojos, ancho de distribución de glóbulos rojos, concentración media de hemoglobina corpuscular en monos machos y hembras (véase Tabla 2 para datos de machos).

Perfilado hematológico en voluntarios sanos. Se administró MOR08159 como una infusión intravenosa única de 0 (placebo), 0,1; 0,3; 1, 3, 10 o 30 mg/kg a voluntarios sanos machos y hembras. Las hembras se confirmaron como posmenopáusicas o quirúrgicamente estériles antes de la infusión. Los parámetros hematológicos que incluyen los recuentos de glóbulos rojos se evaluaron antes de la dosificación como línea base y a las 4 y 8 semanas después de la dosificación. MOR08159 no produjo cambios significativos en los parámetros de los glóbulos rojos en comparación con el placebo durante todo el período de estudio (véase Tabla 3).

#### Resultados:

Efecto sobre el tejido adiposo marrón y los parámetros hematológicos.

La inhibición de la ruta de señalización de ActRIIB por un anticuerpo ActRIIB (Ab) mejora drásticamente la diferenciación de adipocitos marrón primarios como se refleja por un aumento en genes termogénicos tales como UCP-1. Por el contrario, la miostatina, un ligando de ActRIIB, es capaz de inhibir la diferenciación de los adipocitos marrón primarios, un efecto que puede prevenirse mediante la administración de un inhibidor de la ruta de ActRIIB, tal como Ab ActRIIB (Figura 1).

La inhibición de la administración de la vía de señalización de ActRIIB de un Ab ActRIIB durante 4 semanas a ratones no modificados aumentó significativamente no solo la masa del músculo esquelético sino también la grasa marrón interescapular mientras que no se detectaron cambios significativos en la grasa blanca (Figura 2).

La influencia de la inhibición de ActRIIB sobre la funcionalidad del tejido adiposo marrón se evaluó *in vivo* desafiando a los ratones a través de la exposición al frío. Los ratones tratados con el anticuerpo ActRIIB durante cuatro semanas se protegieron significativamente de la hipotermia tras la exposición al frío en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 3). Esto demostró que la inhibición de ActRIIB mejora la termogénesis adaptativa.

Esta protección funcional podría, al menos en parte, ser explicada por un aumento en la respiración celular en adipocitos marrón primarios tratados con Ab ActRIIB (Figura 3). De manera importante, la inhibición farmacológica de la señalización de ActRIIB usando un anticuerpo ActRIIB dio como resultado una cantidad incrementada de grasa parda en animales adultos, y se tradujo en mayor gasto de energía y termogénesis (Figuras 2 y 3).

La inhibición de ActRIIB provocada por la administración semanal de un anticuerpo ActRIIB durante 13 semanas (total de 14 dosis) en monos cynomolgus no causó ningún cambio hematológico significativo a lo largo del estudio en glóbulos rojos, ancho de distribución de glóbulos rojos y concentración media de hemoglobina corpuscular (véase Tabla 2). De forma similar, la administración intravenosa única de Ab ActRIIB en voluntarios sanos humanos hasta 30 mg/kg no indujo ningún cambio significativo en los glóbulos rojos/parámetros hematológicos hasta 10 semanas después de la dosificación (véase Tabla 3).

Tabla 2: Parámetros hematológicos después de 13 semanas de aplicación de MOR08159 en monos cynomolgus (E3= 10<sup>3</sup> y E6 = 10<sup>6</sup>)

		Dosis (mg/kg) i.v.			
		0 (n = 5)	10 (n = 3)	30 (n = 3)	100 (n = 5)
RBC (E6/ $\mu$ L)	Dosificación previa	5,97 $\pm$ 0,388	5,98 $\pm$ 0,255	5,70 $\pm$ 0,353	5,74 $\pm$ 0,161
RBC (E6/ $\mu$ L)	Día 92	5,97 $\pm$ 0,536	5,77 $\pm$ 0,206	5,27 $\pm$ 0,215	5,55 $\pm$ 0,151
MCHC (g/dL)	Dosificación previa	30,2 $\pm$ 1,65	30,1 $\pm$ 0,55	29,9 $\pm$ 1,46	31,4 $\pm$ 1,34
MCHC (g/dL)	Día 92	28,8 $\pm$ 1,59	30,1 $\pm$ 0,40	29,4 $\pm$ 0,40	30,4 $\pm$ 1,07
RDW (%)	Dosificación previa	12,6 $\pm$ 0,79	11,9 $\pm$ 0,78	12,1 $\pm$ 1,27	11,9 $\pm$ 0,59
RDW (%)	Día 92	12,8 $\pm$ 0,53	11,6 $\pm$ 0,67	12,0 $\pm$ 1,06	12,1 $\pm$ 0,43

Tabla 3: recuento de glóbulos rojos después de inyección única de MOR08159 en voluntarios sanos humanos (E6 = 10<sup>6</sup>)

	RBC (E6/ $\mu$ L)		
	Dosificación previa (Bas)	semana 4 (d 29)	Semana 8 (d 57)
Placebo (n = 12)	4,87 $\pm$ 0,45	4,85 $\pm$ 0,51	4,81 $\pm$ 0,35
1 mg/kg (n = 6)	5,05 $\pm$ 0,24	4,88 $\pm$ 0,36	5,03 $\pm$ 0,26
3 mg/kg (n = 6)	5,22 $\pm$ 0,41	5,12 $\pm$ 0,22	5,40 $\pm$ 0,24
10 mg/kg (n = 6)	5,12 $\pm$ 0,38	5,07 $\pm$ 0,51	5,05 $\pm$ 0,44
30 mg/kg (n = 6)	5,12 $\pm$ 0,29	5,12 $\pm$ 0,27	5,17 $\pm$ 0,31

5

Efecto sobre los parámetros metabólicos y adipocitos marrón en ratones alimentados con una dieta alta en grasas.

El efecto de la inhibición de la ruta de señalización de ActRIIB por un anticuerpo ActRIIB en ratones alimentados con una dieta rica en grasas puede investigarse en una modalidad terapéutica. Los ratones que muestran alguna disfunción metabólica que consumen una dieta alta en grasas durante varias semanas se tratan con un anticuerpo ActRIIB o vehículo compatible para examinar el beneficio metabólico en los parámetros sanguíneos, niveles de glucosa e insulina, distribución tisular, tejido adiposo marrón termogénico en particular, y firma génica específica del tejido

10

Lista de referencias

15 Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. (2009) Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*; 120 (16): 1640-1645.

Astrup A, Bulow J, Madsen J, et al. (1985) Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*; 248 (5): E507-E515.

20 Bruce KD, Hanson MA (2010) The Developmental Origins, Mechanisms, and Implications of Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*; 140 (3): 648-652.

Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.*; 84 (1): 277-359.

25 Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. (2008) Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*; 8 (5): 347-358.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. (2010) Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008.

JAMA: The Journal of the American Medical Association; 303 (3): 235-241.

Himms-Hagen J (1990) Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J*; 4 (11): 2890-2898.

Klingenspor M (2003) Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol*; 88 (1): 141-148.

- 5 Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, et al. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes obesity metabolism* (2010) Volume: 12, Issue: 2, Editor: John Wiley & Sons, Pages: 158-166.

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al., (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*; 58 (7): 1526-1531.

- 10 Seale P, Bjork B, Yang W, et al., (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*; 454 (7207): 961-967.

van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, et al. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J Med.*; 360 (15): 1500-1508.

- 15 Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, et al., (2011) Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS.ONE.*; 6 (2): e17247.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al., (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J Med.*; 360 (15): 1518-1525.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un anticuerpo antagonista que se une a ActRIIB para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto, en la que el anticuerpo anti-ActRIIB aumenta el tejido adiposo marrón sin aumentar los niveles de glóbulos rojos en dicho sujeto y en el que el anticuerpo anti-ActRIIB comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 23; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 51; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 65; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 79 en la que el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, lipodistrofia, tolerancia alterada a la glucosa, concentración elevada de insulina en plasma, resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular.  
5
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno metabólico resulta o está provocado por una concentración promedio mayor de glucosa en plasma, homeostasis de glucosa anormal y/o concentración elevada de insulina en plasma.  
10
3. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en la que el sujeto padece un trastorno metabólico y un trastorno muscular.  
15
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el trastorno muscular es una atrofia muscular seleccionada del grupo que consiste en sarcopenia asociada a obesidad, sarcopenia y atrofia muscular asociada a diabetes.  
20
5. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el anticuerpo se une a ActRIIB con una afinidad 10 veces o mayor con la que se une a ActRIIA.  
25
6. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el anticuerpo anti-ActRIIB comprende la secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 146 y la secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 141.
7. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el anticuerpo anti-ActRIIB comprendido en dicha composición tiene una función efectora alterada a través de la mutación de la región Fc.
8. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el anticuerpo anti-ActRIIB comprendido en dicha composición está codificado por pBW522 como DSM22873 o pBW524 como DSM22874, depositada en DSMZ el 18.08.2009.