

(19)

Octrooi Centrum
Nederland

(11) 1031674

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1031674

(22) Ingediend: 24.04.2006

(51) Int.Cl.:

C07K16/22 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61P3/08 (2006.01)

A61P19/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C12N5/12 (2006.01)

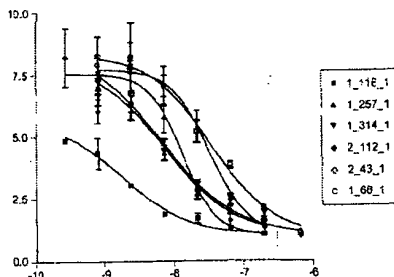
A61P3/04 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30) Voorrang:
25.04.2005 US 60/674933(41) Ingeschreven:
27.10.2006 I.E. 2007/01(47) Dagtekening:
26.04.2007(45) Uitgegeven:
02.07.2007 I.E. 2007/07(73) Octrooihouder(s):
Pfizer Inc. te New York, New York, Verenigde Staten
van Amerika (US).
Amgen Fremont Inc. te Fremont, Californië,
Verenigde Staten van Amerika (US).(72) Uitvinder(s):
Eva Rose Chin te San Diego, Californië (US).
Chikwendu Ibebunjo te New London, Connecticut
(US).
Philip Albert Krasney te Old Lyme, Connecticut (US).
Junming Yie te San Diego, Californië (US).
Joseph Zachwieja te Oceanside, Californië (US).
Larry Green te San Francisco, Californië (US).(74) Gemachtigde:
Mr. Drs. C.J.J. van Loon c.s. te 2508 DH
Den Haag.

(54) Antilichamen tegen myostatine.

(57) De onderhavige uitvinding heeft betrekking op antilichamen omvattende humane antilichamen en antigeenbindend gedeelten daarvan die binden aan myostatine, en die functioneren om myostatine te inhiberen. De uitvinding heeft ook betrekking op humane anti-myostatine antilichamen en antigeenbindende gedeelten daarvan. De uitvinding heeft ook betrekking op antilichamen die chimeer, bispecifiek, gederivatiseerd, enkele keten-antilichamen of gedeelten van fusie-eiwitten zijn. De uitvinding heeft ook betrekking op geïsoleerde zware en lichte keten immunoglobulinen verkregen van humane anti-myostatine antilichamen en nucleïnezuurmoleculen coderende voor zulke immunoglobulinen. De onderhavige uitvinding heeft ook betrekking op werkwijzen voor het maken van humane anti-myostatine antilichamen, samenstellingen omvattende deze antilichamen en werkwijzen voor het toepassen van de antilichamen en samenstellingen voor diagnose en behandeling. De uitvinding verschaft ook gentherapie werkwijzen toepassende nucleïnezuurmoleculen coderende voor de zware en/of lichte immunoglobulinemoleculen die de humane anti-myostatine antilichamen omvatten. De uitvinding heeft ook betrekking op transgene dieren of planten omvattende nucleïnezuurmoleculen van de onderhavige uitvinding.



	1_118_1	1_257_1	1_314_1	2_112_1	2_43_1	1_68_1
EC50	1.305e-008	7.522e-009	3.353e-008	1.154e-008	6.857e-009	3.513e-008

De inhoud van dit octrooi wijkt af van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en). De oorspronkelijk ingediende stukken kunnen bij het Octrooi Centrum Nederland worden ingezien. Octrooi Centrum Nederland is het Bureau voor de Industriële Eigendom, een agentschap van het ministerie van Economische Zaken

NL C 1031674

Titel: Antilichamen tegen myostatine

5 Achtergrond van de uitvinding

[0001] Een groeiend lichaam van bewijs geeft aan dat myostatine (mstn, groei en differentiatiefactor-8 of GDF-8) skeletgroei negatief reguleert. Bijvoorbeeld, een myostatine-nulmutatie in een kind werd geassocieerd met
 10 dramatische spierhypertrofie zonder enige duidelijke abnormaliteiten (Schuelke et al. (2004) Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrofie in a Child, New Engl. J. Med. 350:2682-8). Een negatieve correlatie tussen spiermyostatine-eiwitniveaus en skeletspiermassa werd
 15 ook gedemonstreerd (Schulte, J.N. en Yarasheski, K.E. (2001). Effecten van weerstandstraining op de snelheid van spiereiwietsynthese in tengere oudere mensen. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. 11 suppl.: S111-820; Walker KS et al. (2004) Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in
 20 healthy men. Med. Sci Sports Exerc. 36(5):787-93). Bijvoorbeeld, is er een toegenomen expressie van spiermyostatineniveaus met leeftijd en toegenomen myostatine-expressie werd ook getoond bij te dragen aan
 muscle wasting in HIV-geïnfekteerde patiënten (Gonzalez-cadavid et al. (1998) Organization of the human myostatin gene en expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. PNAS 95:14938-4321).
 Daarbij, zijn verhoogde myostatineniveaus gevonden in polulaties van
 25 ouderen. (Yarasheski KE et al., (2002) Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 62-92 year old women en men with muscle wasting. J. Nutr. Health Aging 6(5):343-8). Myostatine beïnvloedt ook botmassa
 aangezien myostatine-deficiënte muizen toegenomen botmineraaldichtheid hebben (Hamrick et al., (2003) Bone Architecture en Disc Degeneration in
 30 the Lumbar Spin of Mice lacking GDF-8 (Myostatin). J. Orthopaedic Res. 21:1025-1032 (en referenties daarin).

[0002] Antilichamen tegen circulerend myostatine zijn getoond toegenomen spiermassa en verbeterde glucosehomeostase te veroorzaken in muizenmodellen van type 2 diabetes mellitus. Inhibitie van myostatine door ip-injectie van een neutraliserend antilichaam verhoogt skeletspiermassa, verlaagt vastend bloedglucose en verbetert glucosegevoeligheid in obese diabetische muizen (Li X. et al. (2002) Inhibition of myostatin increases muscle mass en improves glucose sensitivity in obese, diabetic mice. Poster #224, in Keystone Symposia: Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics en New Therapies). Daarbij A^y/a muizen zijn bekend insulineresistentie te ontwikkelen en worden toegepast als een model voor type 2-diabetes. Wanneer A^y/a muizen myostatinemissend worden gemaakt door deletie van het myostatine locus, hebben zij normaal gevoede glucose- en insulineniveaus, en verlagen dramatisch glucoseniveaus volgend op een exogene glucosetoediening in vergelijking met normale A^y/a muizen (McPherron et al. (2002) J. Clin. Invest. 109:595-601).

[0003] De schadelijk spier, bot en metabolische defecten geassocieerd met myostatine inachtgenomen, is er een urgente noodzaak voor antilichamen als therapeutica die specifiek zijn voor myostatine en welke condities voorkomen of behandelen door reduceren van myostatineactiviteit, zowel antilichamen als diagnostica om individuen te identificeren die behandeling om myostatineactiviteit te reduceren nodig hebben.

Samenvatting van de uitvinding

25

[0004] De uitvinding verschaft anti-myostatine antilichamen, nucleïnezuren hiervoor coderende, vectoren en gastheercellen voor produceren van de antilichamen, samenstellingen en kits omvattende de antilichamen en werkwijzen voor maken en toepassen van de antilichamen. Verschillende uitvoeringsvormen van de uitvinding

30

beschreven in de volgende genummerde paragrafen omvatten, maar zijn niet beperkt tot deze.

1. Een humaan, chimeer of gehumaniseerd monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan dat specifiek bindt aan myostatine.

2. Het monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens paragraaf 1 waarin het myostatine humaan myostatine is.

3. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam of gedeelte selectief ten minste 50-maal meer myostatine bindt dan GDF11.

4. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens paragraaf 3, en waarin genoemd antilichaam of gedeelte myostatinebinding aan een activine type I of type II receptor inhibeert.

5. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens paragraaf 1, waarin het antilichaam of gedeelte daarvan ten minste een eigenschap heeft geselecteerd uit de groep bestaande uit:

(a) wedijvert voor binding aan myostatine met een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) bindt aan hetzelfde epitoom van myostatine als een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;

1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-
 5 F58I, I85V;

c) bindt aan myostatine met substantieel dezelfde K_D als een
 antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;
 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 10 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-
 F58I, I85V; en

d) bindt aan myostatine met substantieel dezelfde off-rate als
 een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;
 15 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-
 F58I, I85V.

20

6. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
 daarvan omvattende:

(a) een CDR-set, CDR1, CDR2 en CDR3, die opeenvolgend
 25 samen ten minste 90% identiek zijn in aminozuursequentie aan zware
 keten CDR's, CDR1, CDR2, en CDR3, opeenvolgend samen, die zijn omvat
 in de aminozuursequentie uiteengezet in een van SEQ ID NOs: 45, 49, 53,
 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 en 118;

(b) een CDR-set, CDR1, CDR2, en CDR3, die opeenvolgend
 30 samen ten minste 90% identiek zijn in aminozuursequentie aan lichte keten

CDR's, CDR1, CDR2, en CDR3, opeenvolgend samen, die zijn omvat in de
aminozuursequentie uiteengezet een van SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63,
67, 71, 75, 83, 87 en 120; of

- (c) een eerste CDR-set van (a) , en een tweede CDR-set van
5 (b).

7. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
daarvan volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam omvat zware
keten CDR's CDR1, CDR2, en CDR3, die opeenvolgend samen ten minste
10 90% identiek in aminozuursequentie zijn aan zware keten CDR's, CDR1,
CDR2, en CDR3, opeenvolgend samen, die zijn omvat in de
aminozuursequentie uiteengezet in een van SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61,
65, 69, 73, 77, 81, 85 en 118.

15 8. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
daarvan volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam omvat lichte
keten CDR's CDR1, CDR2, en CDR3, die opeenvolgend samen ten minste
90% identiek zijn in aminozuursequentie aan lichte keten CDR's, CDR1,
CDR2, en CDR3, opeenvolgend samen, die zijn omvat in de
20 aminozuursequentie uiteengezet in een van SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63,
67, 71, 75, 83, 87 en 120.

9. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend
25 gedeelte de zware keten CDR1, CDR2 en CDR3 sequenties omvat gevonden
in een van SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 of 118.

10. Een monoklaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend

gedeelte de lichte keten CDR1, CDR2 en CDR3 sequenties omvat gevonden in een van SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87 of 120.

11. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
5 volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam of gedeelte omvat een zware keten dat toepast een humaan VH 1-02 gen, een humaan VH 3-21 gen of een humaan VH 3-23 gen.

12. Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte
10 volgens paragraaf 1, waarin genoemd antilichaam of gedeelte omvat een lichte keten dat toepast een humaan V_KL2 gen, een humaan V_KA3 gen of een humaan V_KA30 gen.

13. Een monoklonaal antilichaam volgens paragraaf 1 omvattende
15 een V_H domein ten minste 90% identiek in aminozuursequentie aan het V_H domein in een van SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 of 115.

14. Een monoklonaal antilichaam volgens paragraaf 1 omvattende
20 een V_L domein ten minste 90% identiek in aminozuursequentie aan het V_L domein in een van SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 of 117.

15. Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte
25 volgens paragraaf 1 dat specifiek myostatine bindt, waarin:

(a) de zware keten omvat de zware keten CDR1, CDR2 en CDR3 aminozuursequenties van een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1;
30 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K;

1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V;
 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M,
 L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

- (b) de lichte keten omvat de lichte keten CDR1, CDR2 en
 5 CDR3 aminozuursequenties van een antilichaam geselecteerd uit de groep
 bestaande uit 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1;
 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K;
 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V;
 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M,
 10 L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; of

(c) het antilichaam omvat een zware keten van (a) en een
 lichte keten van (b).

16. Een monoklonaal antilichaam volgens paragraaf 12 verder
 15 omvattende een V_L domein ten minste 90% identiek in aminozuursequentie
 aan het variabele domein in een van SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28,
 32, 36, 40, 44 of 117.

17. Een monoklonaal antilichaam geselecteerd uit de groep
 20 bestaande uit:

(a) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
 uiteengezet in SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4.

(b) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
 uiteengezet in SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 8;

- 25 (c) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
 uiteengezet in SEQ ID NO: 10 en SEQ ID NO: 12;

(d) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
 uiteengezet in SEQ ID NO: 14 en SEQ ID NO: 16;

- (e) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
 30 uiteengezet in SEQ ID NO: 18 en SEQ ID NO: 20;

(f) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 22 en SEQ ID NO: 24;

(g) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 26 en SEQ ID NO: 28;

5 (h) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 30 en SEQ ID NO: 32;

(i) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 34 en SEQ ID NO: 36;

(j) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
10 uiteengezet in SEQ ID NO: 38 en SEQ ID NO: 40;

(k) een antilichaam omvattende aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 42 en SEQ ID NO: 44; and

(l) een antilichaam omvatten de aminozuursequenties
uiteengezet in SEQ ID NO: 115 en SEQ ID NO: 117.

15

18. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
daarvan geselecteerd uit de groep bestaande uit:

(a) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
20 ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4.

(b) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 6 en SEQ ID NO: 8;

(c) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
25 omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 10 en SEQ ID NO: 12;

(d) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 14 en SEQ ID NO: 16;

(e) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 18 en SEQ ID NO: 20;

5 (f) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 22 en SEQ ID NO: 24;

(g) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 26 en SEQ ID NO: 28;

10 (h) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 30 en SEQ ID NO: 32;

(i) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
15 ID NO: 34 en SEQ ID NO: 36;

(j) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 38 en SEQ ID NO: 40;

20 (k) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 42 en SEQ ID NO: 44; and

(l) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte omvattende de
variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 115 en
SEQ ID NO: 117.

25

19. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
daarvan omvattende een eerste CDR sequentieset omvattende een eerste
CDR1, eerste CDR2 en eerste CDR3 en een tweede CDR sequentieset
omvattende een tweede CDR1, tweede CDR2 en tweede CDR3, waarin
30 genoemde eerste CDR set en genoemde tweede CDR set elk opeenvolgend

samen ten minste 90% identiteit hebben aan de CDR1, CDR2 en CDR3 sequenties, opeenvolgend samen, van:

- (a) SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4, respectievelijk;
- (b) SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 8, respectievelijk;
- 5 (c) SEQ ID NO:10 en SEQ ID NO:12, respectievelijk;
- (d) SEQ ID NO:14 en SEQ ID NO:16, respectievelijk;
- (e) SEQ ID NO:18 en SEQ ID NO:20, respectievelijk;
- (f) SEQ ID NO:22 en SEQ ID NO:24, respectievelijk;
- (g) SEQ ID NO:26 en SEQ ID NO:28, respectievelijk;
- 10 (h) SEQ ID NO:30 en SEQ ID NO:32, respectievelijk;
- (i) SEQ ID NO:34 en SEQ ID NO:36, respectievelijk;
- (j) SEQ ID NO:38 en SEQ ID NO:40, respectievelijk;
- (k) SEQ ID NO:42 en SEQ ID NO:44, respectievelijk; en
- (l) SEQ ID NO:115 en SEQ ID NO:117, respectievelijk.

15

20. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende een eerste CDR sequentieset omvattende een eerste CDR1, eerste CDR2 en eerste CDR3 en een tweede sequentieset omvattende een tweede CDR1, tweede CDR2 en tweede CDR3, waarin

20 genoemde eerste CDR set en genoemde tweede CDR set elk de CDR1, CDR2 en CDR3 sequenties zijn, opeenvolgend samen, van

- a) SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4, respectievelijk;
- (b) SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 8, respectievelijk;
- (c) SEQ ID NO:10 en SEQ ID NO:12, respectievelijk;
- 25 (d) SEQ ID NO:14 en SEQ ID NO:16, respectievelijk;
- (e) SEQ ID NO:18 en SEQ ID NO:20, respectievelijk;
- (f) SEQ ID NO:22 en SEQ ID NO:24, respectievelijk;
- (g) SEQ ID NO:26 en SEQ ID NO:28, respectievelijk;
- (h) SEQ ID NO:30 en SEQ ID NO:32, respectievelijk;
- 30 (i) SEQ ID NO:34 en SEQ ID NO:36, respectievelijk;

- (k) SEQ ID NO:38 en SEQ ID NO:40, respectievelijk;
- (l) SEQ ID NO:42 en SEQ ID NO:44, respectievelijk; en
- (m) SEQ ID NO:115 en SEQ ID NO:117, respectievelijk.

5 21. Een monoklonaal antilichaam dat specifiek myostatine bindt
omvattende de zware keten aminozuursequentie uiteengezet in SEQ ID
NO:115 en de lichte keten aminozuursequentie uiteengezet in SEQ ID
NO:117.

10 22. Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte
daarvan omvattende de variabele regio's omvat in SEQ ID NO:115 en SEQ
ID NO:117.

15 23. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
daarvan, die specifiek myostatine bindt omvattende CDRs CDR1, CDR2, en
CDR3 ómvat in SEQ ID NO:115 en SEQ ID NO:117.

20 24. Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte
daarvan genoemd monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
bindt aan peptide 1 en peptide 5 gedeelten van myostatine, waarin peptide
1 omvat de aminozuursequentie van SEQ ID NO: 103 en peptide 5 omvat de
aminozuursequentie van SEQ ID NO: 107.

25 25. Een antilichaam geproduceerd door een cel hebbende ATCC
Deposit Designation Number geselecteerd uit de groep bestaande uit PTA-
6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572,
PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576.

30 26. Een farmaceutische samenstelling omvattende een antilichaam
of een antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25 en een
farmaceutisch acceptabele drager.

27. Een farmaceutische samenstelling volgens paragraaf 26, verder omvattende ten minste een therapeutisch agens.

5 28. Een werkwijze omvattende de stap van toediening aan genoemde patiënt van een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25 of de farmaceutische samenstelling volgens paragraaf 26, waarin genoemd antilichaam, antigeenbindend gedeelte of farmaceutische samenstelling myostatineactiviteit inhibeert,
10 waarin genoemde patiënt het nodig heeft spiermassa te laten toenemen, het promoten van skeletspierontwikkeling, de behandeling van een spier wasting-ziekte of het versterken van skeletspiergroei.

 29. Een geïsoleerde cellijn die produceert een antilichaam of een
15 antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25 of de zware keten of lichte keten van genoemd antilichaam of genoemd antigeenbindend gedeelte.

 30. Een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul omvattende een
20 nucleotidesequentie die codeert voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan of de lichte keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan van een antilichaam volgens een van paragrafen 1 - 25.

 31. Een vector omvattende het nucleïnezuurmolecuul volgens
25 paragraaf 30, waarin de vector optioneel omvat een expressie controlesequentie operabel verbonden aan het nucleïnezuurmolecuul.

 32. Een gastheercel omvattende de vector volgens paragraaf 31 of het nucleïnezuurmolecuul volgens paragraaf 30.

33. Een werkwijze voor het produceren van een anti-myostatine antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan, omvattende het kweken van de gastheercel volgens paragraaf 32 of de cellijn volgens paragraaf 29 onder geschikte condities en het terugwinnen van genoemd
5 antilichaam of antigeenbindend gedeelte.

34. Een niet-humaan transgeen organisme dragende het nucleïnezuur volgens paragraaf 30 ofwel chromosomaal ofwel extrachromosomaal, waarin het niet-humane transgene organisme
10 genoemd nucleïnezuur tot expressie brengt.

35. Een werkwijze voor het isoleren van een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan dat specifiek bindt aan myostatine, omvattende de stap van het isoleren van het antilichaam uit het niet-
15 humane transgene organisme volgens paragraaf 34.

36. Een werkwijze voor het behandelen van een patiënt die het nodig heeft met een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan dat specifiek bindt aan myostatine omvattende de stappen van:

20 (a) toedienen aan genoemde patiënt van een effectieve hoeveelheid van een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul volgens paragraaf 30; en

(b) het tot expressie brengen van genoemd nucleïnezuurmolecuul.

25

37. Een werkwijze voor het produceren van een humaan monoklonaal antilichaam dat specifiek bindt aan myostatine, omvattende de stappen van:

(a) het immuniseren van niet-humaan transgeen dier dat in
30 staat is om humane antilichamen met myostatine te produceren, een

immunogeen gedeelte van myostatine, of een cel of weefsel myostatine tot expressie brengende;

(b) het toestaan van het niet-humane transgene dier om een immuunrespons tegen myostatine op te bouwen;

5 (c) het isoleren van B lymfocyten uit het niet-humane transgene dier; en

(d) het isoleren van een monoklonaal antilichaam dat specifiek bindt aan myostatine uit genoemde geïsoleerde B lymfocyten.

10 38. Een geïsoleerd antilichaam geproduceerd door de werkwijze volgens paragraaf 37.

39. Een werkwijze voor het inhiberen van de binding van myostatine aan cellen tot expressie brengende een activine type II of IIB
15 receptor omvattende het in contact brengen van het myostatine met een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

20 40. Een werkwijze voor het laten toenemen van myoblast proliferatie omvattende het in contact brengen van een samenstelling omvattende myoblasten en myostatine met een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit
25 inhibeert.

41. Een werkwijze omvattende het toedienen aan een patient van een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert, waarin genoemde patiënt het nodig
30 heeft glucosehomeostase te verbeteren, vetmassa te verminderen,

insulinegevoeligheid toe te laten nemen, nierfunctie te verbeteren, vetaccumulatie af te laten nemen, een ziekte of conditie gekarakteriseerd door botverlies, genoemde ziekte of conditie omvattende osteoporose, osteopenie, osteoarthritis en botfracturen te behandelen, te voorkomen of te
 5 inhiberen, metaboolsyndroom te behandelen, "muscle wasting" tegen te gaan door gedurende de tijd dat genoemde patiënt behandeling ondergaat met een glucocorticoïd of een steroid hormoon.

10 42. Een werkwijze voor het reduceren van myostatineactiviteit in een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit
 15 inhibeert.

43. Een werkwijze voor het omkeren van leeftijdgerelateerde afname in spiermassa in een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of een
 20 antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

25 44. Een werkwijze voor het laten toenemen van myoblastproliferatie en differentiatie in een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

45. Een werkwijze voor het reduceren van myostatine-geïnduceerde activine type IIA of IIB membraanreceptor gemedieerde celsignalering in een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens
 5 een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

46. Een werkwijze voor het verminderen van myostatine-gemedieerde activatie van een activine type I membraanreceptor in een
 10 patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

15 47. Een werkwijze voor het reduceren van myostatine-gemedieerde fosforylatie van een of meer R-smad eiwitten geselecteerd uit de groep bestaande uit: Smad 2 en Smad 3 in een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 18,
 20 waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

48. Een werkwijze voor het verhogen van expressie van een gen geselecteerd uit de groep bestaande uit: myoD, myf5 en myogenine, in een
 25 patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

49. Een werkwijze voor het bevorderen van spiergroei, gewichtstoename of het helpen in de preventie van zwakte in vee, varkens, schapen, kippen, kalkoenen, paarden, vissen, honden en katten, die het nodig hebben omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt
 5 van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

50. Een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte
 10 geselecteerd uit de groep bestaande uit:

(a) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 45 en SEQ ID NO:47;

(b) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
 15 omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO:49 en SEQ ID NO:51;

(c) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 53 en SEQ ID NO:55;

(d) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
 20 omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO:57 en SEQ ID NO:59;

(e) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
 25 ID NO:61 en SEQ ID NO:63;

(f) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO:65 en SEQ ID NO:67;

(g) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO:69 en SEQ ID NO:71;

(h) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
5 omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO:73 en SEQ ID NO:75;

(i) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO:77 en SEQ ID NO:79;

10 (j) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO:81 en SEQ ID NO:83; en

(k) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
15 ID NO:85 en SEQ ID NO:87; en

(l) een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan
omvattende de variabele domein aminozuursequenties uiteengezet in SEQ
ID NO: 118 en SEQ ID NO:120.

20 51. Een werkwijze voor het behandelen van metabool syndroom in
een patiënt die het nodig heeft omvattende de stap van het toedienen aan
genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens
een van paragrafen 1 - 25, waarin genoemd antilichaam of
antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

25

52. Een zoogdier gastheercellijn omvattende polynucleotiden die
coderen voor de zware en lichte ketens van een humaan, chimeer of
gehumaniseerd monoklonaal antilichaam dat wedijvert voor binding aan
myostatine met een antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan,

waarin het antilichaam of gedeelte daarvan ten minste een eigenschap heeft geselecteerd uit de groep bestaande uit:

(a) wedijvert voor binding aan myostatine met een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1;
 5 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K;
 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M;
 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I;
 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) bindt aan hetzelfde epitoom van myostatine als een
 10 antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;
 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M, L-
 15 F58I, I85V;

(c) bindt aan myostatine met substantieel dezelfde K_D als een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;
 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 20 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M; L-
 F58I, I85V; en

(d) bindt aan myostatine met substantieel dezelfde off-rate als een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3;
 25 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1;
 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A;
 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L I85V; en 2_112_1H-L81M; L-
 F58I, I85V.

53. Een zoogdier gastheercellijn omvattende polynucleotiden coderende voor de zware en lichte ketens van een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan dat wedijvert voor binding aan myostatine met een antilichaam omvattende:

- 5 (a) een zware keten die toepast een humaan V_H 1-02 gen, een humaan V_H 3-21 gen of een humaan V_H 3-23 gen; en
- (b) een licht keten dat toepast een humaan V_K L2 gen, een humaan V_K A3 gen of een humaan V_K A30 gen.

- 10 54. Een zoogdier gastheercellijn omvattende polynucleotiden coderende voor de zware en lichte ketens van een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte van genoemd monoklonaal antilichaam hebbende dezelfde aminozuursequentie als het antilichaam geproduceerd door een hybridomacellijn hebbende ATCC Deposit Designation Number
- 15 geselecteerd uit de groep bestaande uit PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576.

55. Een zoogdier gastheercellijn omvattende polynucleotiden
- 20 coderende voor een antilichaam hebbende dezelfde aminozuursequentie als het antilichaam geproduceerd door een hybridomacel hebbende ATCC Deposit Designation Number geselecteerd uit de groep bestaande uit PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576.

25

56. Een werkwijze omvattende het tot expressie brengen van genoemd humaan monoklonaal antilichaam in genoemde zoogdier gastheercellijn van een van paragrafen 52 - 55 en het terugwinnen van genoemd humaan monoklonaal antilichaam.

30

57. Een hybridomacellijn geselecteerd uit de groep bestaande uit ATCC Deposit Designation Numbers PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576

5

58. Een zoogdier gastheercellijn omvattende polynucleotiden coderende voor de zware en lichte ketens van een humaan, chimeer of gehumaniseerd monoklonaal antilichaam, waarin het antilichaam of gedeelte daarvan ten minste een eigenschap heeft geselecteerd uit de groep

10 bestaande uit :

(a) wedijvert voor binding aan mysostatine met een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) bindt aan hetzelfde epitoom van myostatine als een antilichaam geselecteerd uit de groep bestaande uit: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; en 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) is een antilichaam hebbende dezelfde aminozuursequentie als het antilichaam geproduceerd door een hybridomacel hebbende een ATCC Deposit Designation Number geselecteerd uit de groep bestaande uit PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576; en

(d) is een hybridomacellijn geselecteerd uit de groep bestaande uit ATCC Deposit Designation Numbers PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, en PTA-6576.

5

Korte beschrijving van de figuren

[0005] Figuur 1 toont de resultaten van een myostatine-responsive reporter gen assay. Zoals getoond, inhiberen neutraliserende anti-myostatine antilichamen myostatine geïnduceerde luciferaseactiviteit in A204-cellen. Menselijke antilichaamvarianten 1_116_1L-Q45K; 1_257-1L-L211; 1_314_1H-T92A en 2_112_1H-l2V, L-F 581, l85V inhibeerden luciferaseactiviteit in dezelfde mate als wildtype antilichamen.

[0006] Figuur 2 toont de resultaten van een L6-Aurora beta-lactamaseassay. Zoals getoond, inhiberen neutraliseren anti-myostatine antilichamen myostatine geïnduceerde beta-lactamaseactiviteit in L6-ratmyoblasten. Humane antilichaamvarianten 1_116_1L-Q45K; 1_257-1L-L211; 1_314_1H-T92A en 2_112_1H-l12V, L-F581, l85V inhibeerden beta-lactamaseactiviteit in dezelfde mate als de wildtype antilichamen.

[0007] Figuur 3 toont de resultaten van een western blot. Zoals getoond, inhiberen neutraliserende anti-myostatine antilichamen van de uitvinding myostatine geïnduceerde smad2-fosforylatie in HepG2-cellen door wester blot.

[0008] Figuur 4 toont de resultaten van myf5 mRNA-expressieassays. (A) Neutraliserende anti-myostatine antilichamen 1_268_1, 2_177_1 en 2_122_1 redden myf5-genexpressie-geïnhibeerd door myostatine in C2C12-muizenmyoblasten, terwijl een niet-neutraliserend antilichaam 1_159_1 het niet kon. Myf5 mRNA-niveau werd gedetecteerd door TaqMan PCR. (B) 1_116_1 redde myf5-genexpressie op een dosisafhankelijke wijze.

[0009] Figuur 5 toont de resultaten van C2C12-spierceldifferentiatieassays. (A) Neutraliserende anti-myostatine antilichamen 2_43_1,1_314_1 en 1_257_1 redden myostatinegeblokkeerde spierdifferentiatie in C2C12-muisspiercellen. Embrio myosine-zware keten(MHC)-eiwitniveau werd toegepast een marker om C2C12-differentiatie te meten. (B) Antilichamen 2_112_1,1_46_1 en 1_116_1 redden myostatine-geblokkeerde C2C12-spiersdifferentiatie.

[0010] Figuur 6 (A) illustreert peptiden gegenereerd uit matuur GDF8 (SEQ ID NO: 89) om anti-myostatine antilichaambinding te testen. Amino-zuren in kleine letters zijn de amino-zuren die verschillend zijn van GDF11 (B) Samenvatting van peptidebinding. Zoals getoond in de figuur, binden sommige antilichamen niet aan een van de peptiden. Sommige antilichamen binden aan niet-aaneengesloten peptiden. (C) Voorspelde GDF8-structuur met de illustratie van peptidebinding van de humane anti-myostatine antilichamen. GDF8-structuur werd gegenereerd SWISS-MODEL toepassende; een volledig geautomatiseerde eiwitstructuurhomologie-modellerende server, toegankelijk via de ExPASy web server, of van het programma DeepView (Swiss Pdb-Viewer). De eerste zeven amino-zuren misten uit de voorspelde structuur. Matuur GDF8 is een homodimeereiwit. Maar een subunit is getoond. De antilichamen hierin beschreven binden aan GDF8 als een homodimeer. Zoals getoond in de figuur, binden humane monoklonale antilichamen 2_43_1,2_112_1 en 2_177_1 aan zowel peptide 1 als 5. Peptiden 1 en 5 zijn ruimtelijk vlakbij maar niet in primaire structuur.

[0011] Figuur 7 toont de amino-zuursequenties van peptide 1-11 en corresponderende sequence identifiers (SEQ ID NOs: 101-113).

[0012] Figuur 8 toont epitopebinding. Epitopebinding van de humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding werd in kaart gebracht door kruis-competitie-experimenten een BIAcoreTM-instrument 3000 toepassende. Antilichamen zijn getoond als gelabelde cellen. Antilichamen

in een cirkel wedijveren met antilichamen in overlappende cirkels. Bijvoorbeeld, antilichaam 1_46_1 wedijvert met antilichaam 1_136_3, maar antilichaam 1_46_1 wedijvert niet met antilichaam 1_268_1. Indien twee of meer antilichamen in dezelfde cirkel zijn kan hun respectievelijke binding
 5 niet worden onderscheiden.

[0013] Figuur 9 toont de resultaten van een immunoprecipitatiestudie om de mogelijkheid van humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding om matuur GDF8 en matuur GDF8/propeptide latent complex naar beneden te trekken, te testen. Geconditioneerd medium bevattende
 10 293T-cellen getransfecteerd met GDF8 werd toegepast. Zoals getoond in de figuur, antilichamen 2_112_1, 2_43_1 en 2_177_1 trokken naar beneden matuur GDF8, matuur GDF8/propeptidecomplex, en niet-geprocessed GDF8; antilichaam 1_66_1 trok naar beneden matuur GDF8 en matuur GDF8/propeptide; geen andere antilichamen trokken naar beneden matuur
 15 GDF8, propeptide, of niet-geprocessed GDF8. Lane 4 is de 1/10-mediumgeladen controle, en lane 7 is immunoprecipatiecontrole met medium alleen.

[0014] Figuur 10 toont de resultaten van een immunoprecipitatiestudie om de mogelijkheid van anti-myostatine antilichamen van de uitvinding om
 20 matuur GDF8 uit muizenserum naar beneden te trekken, te testen. Zoals getoond is de figuur, antilichamen 2_112_1, 2_43_1 en 2_177_1 trokken naar beneden matuur GDF8 uit het muizenserum, terwijl antilichamen 1_116_1 en 1_66_1 het niet konden.

[0015] Figuur 11 is een sequentie-alignment van matuur humaan GDF8
 25 en GDF11. Matuur GDF8 (SEQ ID NO: 89) en GDF11 (SEQ ID NO: 90) delen ongeveer 90% identieke aminozuursequenties. Zowel matuur GDF8 als GDF11 vormen homodimeren. Zowel matuur GDF8 als GDF11 hebben negen cysteïnes, welke vier interne disulfidebindingen vormen en een intermoleculaire disulfidebinding. Zoals getoond in de figuur, zijn cysteïnen
 30 die een disulfidebond met elkaar vormen, gelabeld met dezelfde punten of

plus. Een cysteïne (cys73) die intermoleculaire disulfidebinding vormt, werd gelabeld met een ster. GDF8-structuur werd voorspeld SWISS-MODEL toepassende (zie figuur 6C).

[0016] Figuur 12 is een tabel in vitro assaygegevens samenvattende.

- 5 [0017] Figuur 13 is een tabel gen toepassing, epitope binding en peptidebinding samenvattende.

- [0018] Figuren 14 en 15 tonen de effecten op spiermassa in muizen volgende op in vivo behandeling met anti-myostatine antilichamen zoals vergeleken met drager voor de gastrocnemius-pantaris-sloeus (GPS)-, 10 tibialis anterior (TA)- en quadriceps (Quads)-spieren.

[0019] Figuur 16 toont de effecten op spiergewicht en kracht in SCID-muizen volgend op in vivo behandeling met een anti-myostatine antilichaam (2_112_K).

- [0020] Figuur 17 illustreert de effecten op spiergewicht in SCID-muizen 15 volgende op in vivo behandeling met verschillende doses van een anti-myostatine-antilichaaam (2_112_K).

[0021] Figuur 18 is een dosis (A) en concentratie (B) responsanalyse van verschillende doses van een anti-myostatine antilichaam (2_112_K) en hun effecten op spiergewicht.

- 20 [0022] Figuur 19 is een alignment van de zware en lichte keten variabele regio's van antilichamen 2_112_1 (zware keten: SEQ ID NO: 77; lichte keten: SEQ ID NO: 79) en 2_112_K (zware keten: SEQ ID NO: 118; lichte keten: SEQ ID NO: 120).

- [0023] Figuur 20 toont de effecten op spiermassa (A) en adipose massa (B) 25 in muizen volgend op een in vivo behandeling met cortison met een anti-myostatine antilichaam (2_112_K) zoals vergeleken met drager voor de gastrocnemius-pantaris-sloeus (GPS)-, tibialis anterior (TA)- en quadriceps (Quads)-spieren (in 20A) en de inguinale, epididymale en abdominale vetkussentjemassa's (in 20B).

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

Definities en algemene technieken

- 5 **[0024]** Tenzij anderszins hierin gedefinieerd, zullen wetenschappelijke en technische termen hierin toegepast in verband met de onderhavige uitvinding de betekenissen hebben die gebruikelijk worden begrepen door die van normale vaardigheid in de kunst. Verder, tenzij anders vereist door context, zullen enkele termen meervouden omvatten en meervoudige
- 10 termen zullen het enkelvoud omvatten. In het algemeen, naamgeving toegepast in verband met, en technieken van, cel- en weefselcultuur, moleculaire biologie, immunologie, microbiologie, genetica en eiwit- en nucleïnezuurchemie en hybridisatie beschreven hierin zijn deze welbekend en gebruikelijk toegepast in de kunst.
- 15 **[0025]** De werkwijzen en technieken van de onderhavige uitvinding worden algemeen uitgevoerd volgens conventionele werkwijzen goed bekend in de kunst en zoals beschreven in verschillende algemene en meer specifieke referenties die geciteerd en beschreven worden door de onderhavige beschrijving tenzij anderszins aangegeven. Zie, b.v., Sambrook et al.,
- 20 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{de} editie, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates (1992) en Harlow en Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), hierin opgenomen door
- 25 referentie. Enzymatische reacties en zuiveringstechnieken worden uitgevoerd volgens de specificaties van de fabrikant, zoals gewoonlijk bereikt in de kunst of zoals hierin beschreven. De naamgeving toegepast in verband met, en de laboratoriumprocedures en -technieken van, analytische chemie, synthetische organische chemie, en medicinale en
- 30 farmaceutische chemie hierin beschreven zijn deze goed bekend en

gebruikelijk toegepast in de kunst. Standaardtechnieken worden toegepast voor chemische syntheses, chemische analyses, farmaceutische vervaardiging, formulering, en aflevering, en behandeling van patiënten.

[0026] De volgende termen, tenzij anderszins aangegeven, moeten worden
5 begrepen de volgende betekenissen te hebben:

[0027] De term "polypeptide" omvat natieve of artificiële eiwitten, eiwitfragmenten en polypeptideanalogen van een eiwitsequentie. Een polypeptide kan monomeer zijn of polymeer.

[0028] De term "geïsoleerd eiwit", "geïsoleerd polypeptide" of "geïsoleerd
10 antilichaam is een eiwit, polypeptide of antilichaam dat dankzij zijn oorsprong of bron van derivatie (1) niet geassocieerd is met natuurlijk geassocieerde componenten die het vergezellen in zijn natieve staat, (2) is vrij van andere eiwitten van dezelfde soort, (3) wordt tot uitdrukking gebracht door een cel van een ander soort, of (4) komt niet voor in de
15 natuur. Dus, een polypeptide dat chemisch gesynthetiseerd is of gesynthetiseerd in een cellulair systeem verschillend van de cel waarvan het natuurlijk afkomt, zal "geïsoleerd" zijn van zijn natuurlijk geassocieerde componenten. Een eiwit kan ook worden verkregen substantieel vrij van natuurlijk geassocieerde componenten door isolatie,
20 eiwitzuiveringstechnieken goed bekend in de kunst toepassende.

[0029] In verschillende uitvoeringsvormen is een geïsoleerd anti-myostatine antilichaam een die eiwit A-gezuiverd is (zie, b.v., voorbeeld XVI), een die gesynthetiseerd is door een hybridoma of andere cellijn in vitro, en/of een humaan anti-myostatine antilichaam verkregen van een
25 transgene muis.

[0030] Een eiwit of polypeptide is "substantieel zuiver", "substantieel homogeen" of "substantieel gezuiverd" wanneer ten minste ongeveer 60 tot 75% van een monster een enkel soort van polypeptide toont. Het polypeptide of eiwit kan monomeer of multimeer zijn. Een substantieel
30 zuiver polypeptide of eiwit zal typisch ongeveer 50%, 60%, 70%, 80% of 90%

gewicht/gewicht omvatten van een eiwitmonster, meer gebruikelijk ongeveer 95%, en zal bij voorkeur meer dan 99% zuiver zijn. Eiwitzuiverheid of homogeniteit kan worden aangegeven door een aantal middelen goed bekend in de kunst, zoals polyacrylamidegelelektroforese van een eiwitmonster, gevolgd door visualisatie van een enkele polypeptideband bij kleuring van de gel met een kleuring goed bekend in de kunst. Voor bepaalde doeleinden, kan een hogere resolutie worden voorzien door HPLC of andere middelen goed bekend in de kunst toe te passen voor zuivering.

- 10 **[0031]** De term "niet-humaan transgeen organisme" zoals hierin toegepast refereert aan een niet-humaan transgeen individueel levend ding, omvattende een niet-humaan transgeen dier, plant, bacterie, protist, of schimmel.

- 15 **[0032]** De term "polypeptidefragment" zoals hierin toegepast refereert aan een polypeptide dat een aminoterminaal en/of carboxyterminale deletie heeft, maar waarin de overblijvende aminozuursequentie identiek is aan de corresponderende posities in een natuurlijk voorkomende sequentie . In sommige uitvoeringsvormen, zijn fragmenten ten minste 5, 6, 8 of 10 aminozuren lang. In andere uitvoeringsvormen zijn de fragmenten ten minste 14, ten minste 20, ten minste 50, of ten minste 70, 80, 90, 100, 150 of 200 aminozuren lang.

- 20 **[0033]** De term "polypeptideanaloog" zoals hierin toegepast refereert aan een polypeptide die een segment omvat dat een substantiële identiteit heeft met een gedeelte van een aminozuursequentie en dat ten minste een van de volgende eigenschappen heeft: (1) specifieke binding aan myostatine onder geschikte bindingscondities, (2) mogelijkheid myostatine te inhiberen of activeren. Typisch, omvatten polypeptideanalogen een conservatieve aminozuursubstitutie (of -insertie of -deletie) met betrekking tot de natieve sequentie . Analogen zijn typisch ten minste 20 of 25 aminozuren lang, bij voorkeur ten minste 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 of 200 aminozuren lang of
- 30

langer, en kunnen vaak zo lang zijn als een gehele lengte polypeptide. Sommige uitvoeringsvormen van de uitvinding omvatten polypeptidefragmenten of polypeptideanaloge antilichamen met 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 of 17 substituties van de stamlijnaminozuursequentie.

[0034] In bepaalde uitvoeringsvormen, zijn aminozuursubstituties aan een anti-myostatine antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan deze welke: (1) gevoeligheid voor proteolyse verminderen, (2) gevoeligheid voor oxidatie verminderen, (3) bindingsaffiniteit voor vorming van eiwitcomplexen veranderen, en (4) andere fysisch chemische of functionele eigenschappen van zulke analogen verlenen of veranderen, maar nog steeds specifieke binding aan myostatine behouden. Analogen kunnen verschillende veranderingen van een sequentie omvatten anders dan de normaal voorkomende peptidesequentie. Bijvoorbeeld, enkele of meervoudige aminozuursubstituties, bij voorkeur conservatieve aminozuursubstituties, kunnen worden gemaakt in de normaal voorkomende sequentie, bij voorkeur in het gedeelte van het polypeptide buiten het (de) domein(en) intermoleculaire contacten vormende. Een conservatieve aminozuursubstitutie moet de structurele eigenschappen van de oude sequentie niet substantieel veranderen; b.v., een vervangend aminozuur moet de anti-parallele β -sheet die het immunoglobuline bindingsdomein vormt die voorkomt in de oudersequentie niet veranderen, of andere typen van secundaire structuur die de oudersequentie karakteriseert, verbreken. In het algemeen, zouden glycine en proline niet worden toegepast in een anti-parallele β -sheet. Voorbeelden van door de kunst erkende polypeptide secundaire en tertiaire structuren worden beschreven in *Proteins, Structures en Molecular Principles* (Creighton, Ed. W.H. Freeman en Company, New York (1984); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden en J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York,

N.Y. (1991)); en Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), hierin opgenomen door referentie.

[0035] Niet-polypeptide analogen worden gewoonlijk toegepast in de farmaceutische industrie als medicijnen met eigenschappen analoog aan
 5 deze van het templatepeptide. Deze typen van niet-polypeptide verbindingen worden "polypeptide mimetica" of "peptidomimetica" genoemd. Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber en Freidinger, *TINS* blz. 392 (1985); en Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), hierin opgenomen door referentie. Zulke verbindingen worden vaak ontwikkeld
 10 met behulp van gecomputeriseerde moleculaire modellering. Peptide mimetica die structureel vergelijkbaar zijn aan therapeutisch bruikbare peptiden kunnen worden toegepast om een equivalent therapeutisch of profylactisch effect te produceren. In het algemeen, zijn peptidomimetica structureel vergelijkbaar met een paradigmapolypeptide (dat wil zeggen,
 15 een polypeptide dat een gewenste biochemische eigenschap of farmacologische activiteit heeft), zoals een humaan antilichaam, maar heeft een of meer polypeptidebindingen optioneel vervangen door een binding geselecteerd uit de groep bestaande uit: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis en trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ en $-\text{CH}_2\text{SO}-$, door
 20 werkwijzen goed bekend in de kunst. Systematische substitutie van een of meer aminozuren van een consensussequentie met een D-aminozuur van hetzelfde type (b.v., D-lysine in plaats van L-lysine) kan ook worden toegepast om meer stabiele peptiden te genereren. Daarbij, kunnen constraintpeptiden omvattende een consensussequentie of een substantieel
 25 identieke consensussequentievariatie worden gegenereerd door werkwijzen bekend in de kunst (Rizo en Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), hierin opgenomen door referentie); bijvoorbeeld, door toevoeging van interne cysteïneresiduen in staat intramoleculaire disulfidebruggen te vormen welke het peptide ringvormig maken.

[0036] Waar aan een "antilichaam" wordt gerefereerd hierin met betrekking tot de uitvinding, wordt het normaal begrepen dat een antigeenbindend gedeelte daarvan ook gebruikt kan worden. Een antigeenbindend gedeelte wedijvert met het intacte antilichaam voor
 5 specifieke binding. Zie in het algemeen, Fundamental Immunology, hoofdst. 7 (Paul, W. ed., 2^{de} ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (in zijn geheel opgenomen door referentie voor alle doeleinden). Antigeenbindende gedeelten kunnen worden geproduceerd door recombinante DNA-technieken of door enzymatisch of chemische klieving van intacte anti-lichamen. In sommige
 10 uitvoeringsvormen, omvatten antigeenbindende gedeelten Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, en complementair determinerende regio (CDR)-fragmenten, enkele keten antilichamen (scFv), chimere antilichamen, dialichamen, en polypeptiden die ten minste een gedeelte van een antilichaam omvatten dat voldoende is om specifieke antigeenbinding aan
 15 het polypeptide te bewerkstelligen.

[0037] Van N-terminus naar C-terminus, omvatten zowel de mature lichte als zware keten-variabele domeinen, achtereenvolgens, de regio's FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 en FR4. de toekenning van aminozuren aan elk domein hierin is in overeenstemming met de definities van Kabat,
 20 Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health Bethesda, Md. (1987 en 1991)), Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) of Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

[0038] Zoals hierin toegepast, is een antilichaam waaraan wordt gerefereerd door een nummer hetzelfde als een monoklonaal antilichaam
 25 dat wordt verkregen van de hybridoma van hetzelfde nummer. Bijvoorbeeld, monoklonaal antilichaam 2_112 is hetzelfde antilichaam als een verkregen van hydridoma 2_112, of een subkloon daarvan, zoals 2_112_1, 2_112_2 en dergelijke. De enige uitzondering is 1_136_3 welke een verschillend hybridoma is van subklonen 1_136_1 en 1_136_2.

[0039] Zoals hierin toegepast, betekent een Fd-fragment een antilichaamfragment dat bestaat uit de V_H - en C_H1 -domeinen; een Fv-fragment bestaat uit V_L - en V_H -domeinen van een enkele arm van een antilichaam; en een dAb-fragment (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)

5 bestaat uit een V_H -domein.

[0040] In sommige uitvoeringsvormen, is het antilichaam een enkele-keten antilichaam (scFv) waarin V_L - en V_H -domeinen zijn gepaard om monovalente moleculen te vormen via een synthetische linker die hen in staat stelt gemaakt te worden als een enkele eiwitketen. (Bird et al.,
 10 Science: 242-423-426 (1988) en Huston et al., Proc. Natl. Acad. Scie. V.S., 85:5879-5883 (1988).) In sommige uitvoeringsvormen zijn de antilichamen diabodies, dat wil zeggen, zijn bivalente antilichamen waarin V_H - en V_L -domeinen tot uitdrukking worden gebracht op een enkele polypeptideketen, maar een linker toepassende die tekort is om paring toe te staan tussen de
 15 twee domeinen op dezelfde keten, daardoor de domeinen forcerende te paren met complementaire domeinen van een andere keten en twee antigeenbindingsplaatsen te creëren (zie, b.v., Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Scie. V.S. 90:6444-6448 (1993), en Poljak R.J. et al., Structure 2:1121-1123 (1994).) In sommige uitvoeringsvormen, kunnen een of meer CDR's
 20 van een antilichaam van de uitvinding worden opgenomen in een molecuul ofwel covalent of noncovalent om het een immuno adhesine te maken dat specifiek bindt aan myostatine. In zulke uitvoeringsvormen, kunnen CDR's worden opgenomen als deel van een grotere polypeptideketen, kunnen covalent worden verbonden aan een andere polypeptideketen of kunnen
 25 noncovalent worden opgenomen. Verder, kunnen de frameworkregio's (FR's) worden verkregen van een van de anti-myostatine antilichamen waarvan een of meer van de CDR's zijn genomen of van een of meer verschillende humane antilichamen.

[0041] In uitvoeringsvormen hebbende een of meer bindingsplaatsen, kunnen de bindingsplaatsen identiek zijn aan elkaar of kunnen verschillend zijn.

[0042] Zoals hierin toegepast, betekent de term "humaan antilichaam" een antilichaam waarin de variabele en constante domeinsequenties humane sequenties zijn. De term omvat antilichamen met sequenties verkregen van (d.w.z., die toepassen) humane genen, maar welke veranderd zijn, bijvoorbeeld om mogelijke immunogeniciteit te verminderen, affiniteit te verhogen, cysteïnen te elimineren die ongewenste vouwing kunnen veroorzaken, etc. De term omvat zulke antilichamen geproduceerd recombinant in niet-humane cellen, welke glycosylatie niet typisch voor humane cellen zou kunnen verlenen. Deze antilichamen kunnen worden bereid op verschillende manieren, zoals beneden beschreven.

[0043] De term "chimeer antilichaam" zoals hierin toegepast betekent een antilichaam dat regio's van twee of meer verschillende antilichamen omvat. In een uitvoeringsvorm, zijn een of meer van de CDR's van het chimere antilichaam verkregen van een humaan anti-myostatine antilichaam. In een andere uitvoeringsvorm, zijn alle CDR's verkregen van een humaan anti-myostatine antilichaam. In een andere uitvoeringsvorm, zijn de CDR's van meer dan een humane anti-myostatine antilichamen gecombineerd in een chimeer antilichaam. Bijvoorbeeld, een chimeer antilichaam kan een CDR1 omvatten van de lichte keten van een eerste humaan anti-myostatine antilichaam, een CDR2 van de lichte keten van een tweede humaan anti-myostatine antilichaam en een CDR3 van de lichte keten van een derde humaan anti-myostatine antilichaam, en CDR's van de zware keten kunnen worden verkregen van een of meer andere anti-myostatine antilichamen. Verder, kunnen de frameworkregio's worden verkregen van een van de anti-myostatine antilichamen waarvan een of meer van de CDR's zijn genomen of van een of meer verschillende humane antilichamen.

[0044] In sommige uitvoeringsvormen, is een chimeer antilichaam van de uitvinding een gehumaniseerd anti-myostatine antilichaam. Een gehumaniseerd anti-myostatine antilichaam van de uitvinding omvat de aminozuursequentie van een of meer frameworkregio's en/of de
 5 aminozuursequentie van ten minste een gedeelte van de constante regio van een of meer humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding en omvat verder sequenties verkregen van een niet-humaan anti-myostatine antilichaam, bijvoorbeeld CDR-sequenties.

[0045] Fragmenten of analogen van antilichamen of
 10 immunoglobulinemoleculen kunnen eenvoudig worden bereid door deze van normale vaardigheid in de kunst die de lessen van deze beschrijving volgen. Geprefereerde amino- en carboxyuiteinden van fragmenten of analogen treden op nabij grenzen van functionele domeinen. Structurele en functionele domeinen kunnen worden geïdentificeerd door vergelijking van
 15 de nucleotide- en/of aminozuursequentiegegevens met publieke of private sequentiedatabasen. Bij voorkeur, worden gecomputeriseerde vergelijkingswerkwijzen toegepast om sequentiemotieven of voorspelde eiwitconformatiedomeinen te identificeren die optreden in andere eiwitten van bekende structuur en/of functie. Werkwijzen om eiwitsequenties te
 20 identificeren die vouwen in een bekende driedimensionale structuur zijn bekend. Zie Bowie et al., Science 253:164 (1991).

[0046] De term " oppervlakteplasmonresonantie", zoals hierin toegepast, refereert aan een optisch fenomeen dat de analyse van real-time-biospecifieke interacties door detectie van veranderingen in
 25 eiwitconcentraties binnen een biosensormatrix toestaat, bijvoorbeeld het BIACORE™-systeem toepassende (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Zweden en Piscataway, N.J.). Voor verdere beschrijvingen, zie Johnsson U. et al., Ann. Biol. Clin. 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al. , Biotechniques 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995); en
 30 Johnsson B. et al. , Anal. Biochem 198:268-277 (1991).

[0047] De term " K_D " betekent de evenwichtsdissociatieconstante van een specifieke antilichaam-antigeen interactie.

[0048] De term "off rate" betekent de dissociatiesnelheidconstante van een specifieke antilichaam-antigeen interactie.

- 5 [0049] De term "epitooop" omvat een eiwitdeterminant in staat tot specifieke binding aan een immunoglobuline of T-celreceptor of anderszins interactie met een molecuul. Epitoopt determinante bestaan in het algemeen uit chemisch actieve oppervlaktegroeperingen van moleculen zoals aminozuren of koolhydraat- of suikerzijketens en hebben in het algemeen
- 10 specifieke driedimensionale structuureigenschappen, zowel als specifieke ladingseigenschappen. Een epitooop kan "lineair" of "conformationeel" zijn. In een lineair epitooop, treden alle punten van interactie tussen het eiwit en het interacterende molecuul (zoals een antilichaam) lineair op langs de primaire aminozuursequentie van het eiwit. In een conformationeel epitooop,
- 15 treden de punten van interactie op tussen aminozurenresiduen op het eiwit die gescheiden zijn van elkaar. Een antilichaam wordt gezegd specifiek te binden aan een antigeen wanneer de dissociatieconstante ≤ 1 mM is, bij voorkeur ≤ 100 nM en meest geprefereerd ≤ 10 nM. In bepaalde uitvoeringsvormen, is de K_D 1 pM tot 500 pM. In andere uitvoeringsvormen,
- 20 is de K_D tussen 500 pM tot 1 mM. In andere uitvoeringsvormen, is de K_D tussen 1 mM tot 100 nM. In andere uitvoeringsvormen, is de K_D tussen 100 mM tot 10 nM. Eenmaal een gewenst epitooop op een antigeen is bepaald, is het mogelijk antilichamen te genereren tegen dat epitooop, b.v., toepassende technieken beschreven in de onderhavige uitvinding. Alternatief, gedurende
- 25 het ontdekkingsproces, kunnen de generatie en karakterisering van antilichamen informatie verhelderen over gewenste epitopen. Van deze informatie, is het dan mogelijk om competitief antilichamen te screenen voor binding aan hetzelfde epitooop. Een benadering om dit te bereiken is om cross-competitiestudies uit te voeren om antilichamen te vinden die
- 30 competitief binden aan elkaar, b.v., de antilichamen wedijveren voor

binding aan het antigeen. Een high throughput-proces voor "binderende" antilichamen gebaseerd op hun kruis-competitie wordt beschreven in internationale Octrooiaanvraag nr. WO 03/48731.

[0050] Zoals hierin toegepast, volgen de twintig conventionele aminozuren en hun afkortingen conventioneel gebruik. Zie Immunology – A Synthesis (2^{de} editie, E.S. Golub en D.R. Gren, Eds. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), hierin opgenomen door referentie.

[0051] De term "polynucleotide" zoals hierin gerefereerd betekent een polymere vorm van nucleotides van ten minste 10 basen in lengte, ofwel ribonucleotiden of deoxynucleotiden of een gemodificeerde vorm van elk van deze typen van nucleotide. De term omvat enkel- en dubbelstrengsvormen.

[0052] De term "geïsoleerd polynucleotide" zoals hierin toegepast betekent een polynucleotide van genoom, cDNA of synthetische oorsprong of enige combinatie daarvan, welke dankzij zijn oorsprong het "geïsoleerd polynucleotide" (1) niet geassocieerd is met geheel of een gedeelte van een polynucleotiden met welke de "geïsoleerde polynucleotide" wordt gevonden in de natuur, (2) is operabel verbonden aan een polynucleotide waaraan het niet is verbonden in de natuur, of (3) treedt niet op in de natuur als deel van een grotere sequentie.

[0053] De term "natuurlijk voorkomende nucleotiden" zoals hierin toegepast omvat deoxyribonucleotiden en ribonucleotiden. De term "gemodificeerde nucleotides" zoals hierin toegepast omvat nucleotiden met gemodificeerde of gesubstitueerde suikergroepen en dergelijke. De term "olignucleotidebindingen" hierin gerefereerd omvat oligonucleotidenbindingen zoals fosforothioaat, fosforodithioaat, fosforoselenoaat, fosferodiselenoaat, fosforoanilothioaat, fosforaniladaat, fosforoamidaat, en dergelijke. Zie, b.v., LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides en Analogues: A Practical Approach, blz.

87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); V.S. Octrooi nr. 5,151,510; Uhlmann en Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990), waarvan de beschrijvingen hierin opgenomen zijn door referentie. Een oligonucleotide kan een label voor detectie omvatten, indien gewenst.

- 5 [0054] "Operabel verbonden" sequenties omvatten zowel expressie controlesequenties die aangrenzend zijn met het gen van interesse en expressie controlesequenties die in trans of op afstand werken om het gen van interesse te controleren. De term "expressie controlesequentie" zoals hierin toegepast betekent polynucleotidesequenties die nodig zijn de
- 10 expressie en processing van coderende sequenties waaraan zij geliggeerd zijn te effectueren. Expressie controlesequenties omvatten geschikte transcriptieinitiatie, terminatie, promotor en enhancersequenties; efficiënte RNA-processingsignalen zoals zoals splicing en polyadenylatiesignalen; sequenties die cytoplasmatisch mRNA stabiliseren; sequenties die
- 15 translatie-efficiëntie versterken (d.w.z., Kozak-consensussequentie); sequenties die eiwitstabiliteit versterken; en indien gewenst, sequenties die proteïnesecretie verhogen. De aard van zulke controlesequenties verschilt afhankelijk van het gastheerorganisme. In prokaryoten, omvatten zulke controlesequenties in het algemeen een promotor, ribosomale
- 20 bindingsplaats, en transcriptieterminatiesequentie; in eukaryoten, in het algemeen, omvatten zulke controlesequenties promotors en transcriptieterminatiesequentie. De term "controlesequenties" wordt bedoeld te omvatten, ten minste, alle componenten waarvan aanwezigheid essentieel is voor expressie en processing, en kan ook omvatten additionele
- 25 componenten waarvan aanwezigheid voordelig is, bijvoorbeeld leadersequenties en fusiepartnersequenties.

- [0055] De term "vector", zoals hierin toegepast, betekent een nucleïnezuurmolecuul in staat een ander nucleïnezuur waaraan het verbonden is te transporteren. In sommige uitvoeringsvormen, is de vector
- 30 een plasmide, d.w.z., een circulair dubbelstrengs stuk van DNA waarin

additionele DNA-segmenten geligeerd kunnen zijn. In sommige uitvoeringsvormen, is de vector een virale vector, waarin additionele DNA-segmenten geligeerd kunnen worden in het virale genoom. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de vectoren in staat tot autonome replicatie in een gastheercel waarin zij geïntroduceerd zijn (b.v., bacteriële vectoren hebbende een bacteriële origine van replicatie en episomale zoogdiervectoren). In andere uitvoeringsvormen, kunnen de vectoren (b.v., niet-episomale zoogdiervectoren) geïntegreerd worden in het genoom van een gastheercel bij introductie in een gastheercel, en worden daardoor gerepliceerd tezamen met het gastheergenoom. Daarbij, zijn bepaalde vectoren in staat de expressie van genen waaraan zij operatief verbonden zijn te richten. Zulke vectoren worden hierin gerefereerd als "recombinante expressievectoren" (of eenvoudig, "expressievectoren").

[0056] De term "recombinante gastheercel" (of eenvoudig "gastheercel"), zoals hierin toegepast, betekent een cel waarin een recombinante expressievector geïntroduceerd is. Het moet worden begrepen dat "recombinante gastheercel" en "gastheercel" niet alleen de specifieke cel van onderwerp betekenen maar ook de nakomelingen van zo'n cel. Omdat bepaalde modificaties kunnen optreden in opeenvolgende generaties door ofwel mutatie of omgevingsinvloeden, zouden zulke afstammelingen, in feite, niet identiek kunnen zijn aan de oudercel, maar zijn nog steeds omvat binnen de omvang van de term "gastheercel" zoals hierin toegepast.

[0057] De term "selectief hybridiseren" zoals hierin gerefereerd betekent detecteerbaar en specifiek te binden. Polynucleotiden, oligonucleotiden en fragmenten daarvan volgens de uitvinding hybridiseren selectief aan nucleïnezuurstringen onder hybridisatie en wascondities die waarneembare hoeveelheden van detecteerbare binding aan niet-specifieke nucleïnezuuren minimaliseren. "Hoge stringentie" of "hoog stringente" condities kunnen worden toegepast om selectieve hybridisatiecondities te bereiken zoals bekend in de kunst en hierin beschreven. Een voorbeeld van de "hoge

stringentie" of "hoog stringente" conditie is de incubatie van een polynucleotide met een ander polynucleotide, waarin een polynucleotide bevestigd kan zijn aan een vast oppervlak zoals een membraan, in een hybridisatiebuffer van 6X SSPE of SSC, 50% formamide, 5X Denhardt's reagens, 0,5% SDS, 100µg/ml gedenatureerd, gefragmenteerd zalmsperma-DNA bij een hybridisatietemperatuur van 42°C gedurende 12-16 uur, gevolgd door tweemaal wassing bij 55°C toepassende een wasbuffer van 1X SSC, 0,5% SDS. Zie ook Sambrook et al., supra, blz. 9.50-9.55.

[0058] De term "percentage sequentie-identiteit" in de context van nucleïnezuursequenties bedoelt de residuen in twee sequenties die hetzelfde zijn wanneer op een lijn gezet voor maximale correspondentie. De lengte van sequentie-identiteitvergelijking kan zijn over een lengte van ten minste negen nucleotiden, gebruikelijk ten minste ongeveer 18 nucleotiden, meer gebruikelijk ten minste ongeveer 24 nucleotiden, typisch ten minste ongeveer 28 nucleotiden, en meer typisch ten minste ongeveer 32 nucleotiden, en bij voorkeur ten minste ongeveer 36, 48 of meer nucleotiden. Er is een aantal van verschillende algoritmen bekend in de kunst welke toegepast kunnen worden om nucleotidesequentie-identiteit te meten. Bijvoorbeeld, kunnen polynucleotidesequenties worden vergeleken FASTA toepassende, Gap of Bestfit, welke programma's zijn in Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Groep (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, welke omvat, b.v., de programma's FASTA2 en FASTA3, verschaft alignments en percentagesequentie-identiteit van de regio's van de beste overlap tussen de gevraagde en zoeksequenties (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); hierin opgenomen door referentie). Tenzij anderszins gespecificeerd, worden standaardwaardeparameters voor een specifiek programma of algoritme toegepast. Bijvoorbeeld, percentage sequentieovereenkomst tussen nucleïnezuursequenties kan worden

vastgesteld FASTA toepassende met zijn standaardwaardeparameters (een woordgrootte van 6 en de NOPAM-factor voor de scoringsmatrix) of Gap toepassende met zijn standaardwaardeparameters zoals voorzien in GCG Versie 6.1, hierin opgenomen door referentie.

- 5 **[0059]** Een referentie aan een nucleotidesequentie omvat zijn complement tenzij anderszins gespecificeerd. Dus, een referentie aan een nucleïnezuur hebbende een specifieke sequentie moeten worden begrepen zijn complementaire streng te omvatten, met zijn complementaire sequentie.

- [0060]** Zoals hierin toegepast, worden de termen "percentage sequentie-identiteit en "percentage sequentie homologie" uitwisselbaar toegepast.

- 10 **[0061]** De term "substantiële gelijkenis" of "substantiële sequentiegelijkenis", wanneer refererende aan een nucleïnezuur of fragment daarvan, betekent dat wanneer optimaal op een lijn gezet met geschikte nucleotide-insertie (of -deletie) met een ander nucleïnezuur (of
15 zijn complementaire streng), er een nucleotide sequentie-identiteit is in ten minste ongeveer 85%, bij voorkeur ten minste ongeveer 90%, en meer bij voorkeur ongeveer 95%, 96%, 97%, 98% of 99% van de nucleotidebasen, zoals gemeten door een goed bekend algoritme van sequentie-identiteit, zoals FASTA, BLAST of Gap, zoals hierboven besproken.

- 20 **[0062]** Wanneer toegepast op polypeptiden, betekent de term "substantiële identiteit" dat twee peptidesequenties, wanneer optimaal op een lijn gebracht, zoals door de programma's Gap of BESTFIT standaardwaarde gewichten toepassende zoals verschaft met de programma's, ten minste 70%, 75% of 80% sequentie-identiteit delen, bij voorkeur ten minste 90% of
25 95% sequentie-identiteit, en meer bij voorkeur ten minste 97%, 98% of 99% sequentie-identiteit. In bepaalde uitvoeringsvormen, verschillen residuposities die niet identiek zijn door conservatieve aminozuursubstituties. Een "conservatieve aminozuursubstitutie" is een in welke een aminozuurresidu vervangen wordt door een ander
30 aminozuurresidu hebben een zijketen R-groep met vergelijkbare chemische

- eigenschappen (b.v., lading of hydrofobiciteit). In het algemeen, zal een conservatieve aminozuursubstitutie de functionele eigenschappen van een eiwit niet substantieel veranderen. In gevallen waarin twee of meer aminozuursequenties van elkaar verschillen door conservatieve substituties, kan het percentage sequentie-identiteit worden aangepast naar boven om te corrigeren voor de conservatieve natuur van de substitutie. Middelen voor het maken van deze aanpassing zijn goed bekend aan deze vaardig in de kunst. Zie, b.v., Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Voorbeelden van groepen van aminozuren die zijketens hebben met vergelijkbare chemische eigenschappen omvatten 1) alifatische zijketens: glycine, alanine, valine, leucine en isoleucine; 2) alifatische hydroxylzijketens: serine en threonine; 3) amideomvattende zijketens: asparagine en glutamine; 4) aromatische zijketens: fenylalanine, tyrosine en tryptofaan; 5) basische zijketens: lysine, arginine en histidine; 6) zure zijketens: aspartaanzuur en glutamaatzuur; en 7) zwavelbevattende zijketens: cysteïne en methionine. Conservatieve aminozuursubstitutiegroepen zijn: valine-leucine-isoleucine, fenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamaat-aspartaat en asparagine-glutamine.
- 20 **[0063]** Alternatief, is een conservatieve vervanging een verandering met een positieve waarde in de PAM250 logwaarschijnlijkheidsmatrix beschreven in Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), hierin opgenomen door referentie. Een "gemiddeld conservatieve" vervanging is een verandering met een niet-negatieve waarde in de PAM250
- 25 logwaarschijnlijkheidsmatrix.
- [0064]** Sequentie-identiteit voor polypeptides wordt typisch gemeten sequentieanalysesoftware toepassende. Eiwitanalysesoftware vergelijkt sequenties toepassende metingen van gelijkenis toekend aan verschillende substituties, deleties en andere modificaties, omvattende conservatieve
- 30 aminozuursubstituties. Bijvoorbeeld, GCG omvat programma's zoals "Gap"

en "BESTFIT" welke kunnen worden toegepast met standaardwaardeparameters zoals gespecificeerd door de programma's om sequentiehomologie van sequentie-identiteit vast te stellen tussen sterk gerelateerde polypeptiden, zoals homologe polypeptiden van verschillende
 5 soorten van organismen of tussen een wildtype eiwit en een mutant daarvan. Zie, b.v., GCG Versie 6.1 (University of Wisconsin, WI). Polypeptide-sequenties kunnen ook worden vergeleken FASTA toepassende onder gebruikmaking van standaardwaarden of geadviseerde parameters, zie GCG Versie 6.1. FASTA (b.v., FASTA2 en FASTA3) verschaft
 10 alignments en percentage sequentie-identiteit van de regio's van de beste overlap tussen de gevraagde en zoeksequenties (Pearson, Methods Ezymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000)). Een ander geprefereerd algoritme wanneer vergelijkende een sequentie van de uitvinding met een database omvattende een groot aantal van sequenties
 15 van verschillende organismen is het computerprogramma BLAST, specifiek blastp of tblastn, standaardwaardeparameters toepassende zoals verschaft met de programma's. Zie, b.v., Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997).

[0065] De lengte van polypeptidesequenties vergeleken voor homologie zal
 20 in het algemeen ten minste ongeveer 16 aminozuurresiduen zijn, gebruikelijk ten minste ongeveer 20 residuen, meer gebruikelijk ten minste ongeveer 24 residuen, typisch ten minste ongeveer 28 residuen, en bij voorkeur meer dan ongeveer 35 residuen. Wanneer onderzoekende een databasis omvattende sequenties van een groot aantal van verschillende
 25 organismen, is het geprefereerd aminozuursequenties te vergelijken.

[0066] Zoals hierin toegepast, refereren de termen "label" of "gelabeld" naar inbouw van een ander molecuul in het antilichaam. In een uitvoeringsvorm, is het label een detecteerbare marker, b.v., inbouw van een radiogelabeld aminozuur of verbinding aan een polypeptide of
 30 biotinyleenheden dat kan worden gedetecteerd door gemarkeerd avidine

(b.v., streptavidine omvattende een fluorescente marker of enzymatische activiteit die kan worden gedetecteerd door optische of colorimetrische werkwijzen). In een ander uitvoeringsvormen, kan het label of de marker therapeutisch zijn, b.v., een drugconjugaat of toxine. Verschillende werkwijzen voor labelling van polypeptiden en glycoproteïnen zijn bekend in de kunst en kunnen worden toegepast. Voorbeelden van labels voor polypeptiden omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de volgende: radio-isotopen of radionuclides (b.v., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), fluorescente labels (b.v., FITC, rhodamine, lanthanidefosfors), enzymatische labels (b.v., horseradishperoxidase, β -galactosidase, luciferase, alkalinefosfatase), chemoluminiscente markers, biotinylgroepen, vooraf vastgestelde polypeptide-epitopen herkend door een secundaire reporter (b.v., leucinezipperpaarsequenties, bindingsplaatsen voor secundaire antilichamen, metaalbindende domeinen, epitoolabels), magnetische agentia, zoals gadoliniumchelaten, toxinen zoals pertussistoxine, taxol, cytochalasin B, gramicidine D, ethidiumbromide, emetine, mitomycine, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, doxorubicine, daunorubicine, dihydroxyanthracinedion, mitoxantron, mithramycine, actinomycine D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoïden, procaïne, tetracaïne, lidocaïne, propranolol, en puromycine en analogen of homologen daarvan. In sommige uitvoeringsvormen, zijn labels verbonden door spacer-armen van verschillende lengten om potentiële sterische hindering te verminderen.

[0067] Door heel deze beschrijving en claims, zal het woord "omvatten", of variaties zoals "omvat" of "omvattende", worden begrepen te impliceren de inclusie van een aangegeven element of groep van elementen maar niet de exclusie van een ander element of groep van elementen.

Humane anti-myostatine antilichamen en karakterisering daarvan

[0068] De uitvinding verschaft hierin anti-myostatine antilichamen. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de antilichamen humaan. In andere uitvoeringsvormen, zijn de antilichamen gehumaniseerd. In sommige uitvoeringsvormen, zijn humane myostatine antilichamen geproduceerd door immunisatie van een niet-humaan transgeen dier, b.v., een knaagdier, waarvan het genoom humane immunoglobulinegenen omvat zodat het transgene dier humane antilichaam produceert.

[0069] Een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding kan een humane kappa- of een humane lambda-lichte keten omvatten of een aminozuursequentie daarvan verkregen. In sommige uitvoeringsvormen omvattende een kappa-lichte keten, past het lichte keten-variabele domein (V_L) een humaan A30, A3 of L2 V_K -gen toe.

[0070] In sommige uitvoeringsvormen, omvat de V_L van het anti-myostatine antilichaam een of meer aminozuursubstituties, -deleties of -inserties (addities) in vergelijking met de stamlijn V_K -aminozuursequentie. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de V_L van het anti-myostatine antilichaam 1, 2, 3, 4 of 5 aminozuursubstituties in vergelijking met de stamlijn V_K -aminozuur-sequentie. In sommige uitvoeringsvormen, is een of meer van de substituties van stamlijn in de CDR-regio's van de lichte keten. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de V_K -aminozuursubstituties in vergelijking met de stamlijn op een of meer van dezelfde posities als de substituties in vergelijking met de stamlijn gevonden in een of meer van de V_L van de antilichamen hierin verschaft. Bijvoorbeeld, kan de V_L van een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding een of meer van de aminozuursubstituties omvatten in vergelijking met de stamlijn gevonden in de V_L van antilichaam 1_257_1. Er kunnen ook een of meer aminozuursubstituties zijn vergeleken met de stamlijn gevonden in de V_L van antilichaam 1_116_1, welke hetzelfde V_K -gen toepast als antilichaam 1_257_1. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de aminozuurveranderingen

op een of meer van dezelfde posities, maar omvatten een verschillende substitutie dan in het referentieantilichaam. In alle gevallen, is de omschrijving van een antilichaamkloon met streepjes equivalent aan dezelfde antilichaamkloon met puntjes (b.v., 1_257_1 = 1.257.1).

- 5 **[0071]** In sommige uitvoeringsvormen, treden aminozuursubstituties in vergelijking met de stamlijn op een of meer dezelfde posities op als substituties van de stamlijn in een van de V_L van antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21l; 1_314_1H-T92A; 10 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-l12V; 2_112_1L-F58l; 2_112_1L-l85V; 2_112_1H-L81M, L-F58l; 2_112_1H-L81M, L-l85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58l, l85V, maar de substituties kunnen conservatieve aminozuursubstituties representeren op zulke positie(s) in vergelijking met het aminozuur in het referentieantilichaam. Bijvoorbeeld, als een specifieke 15 positie in een van deze antilichamen is veranderd in vergelijking met de stamlijn en glutamaat is, mag iemand aspartaat substitueren op die positie. Vergelijkbaar, als een aminozuursubstitutie vergeleken met de stamlijn in een voorbeeldantilichaam serine is, mag iemand threonine voor serine op die positie conservatief substitueren. Conservatieve aminozuursubstituties 20 zijn hierboven besproken, door heel deze aanvraag.

- [0072]** In sommige uitvoeringsvormen, omvat het anti-myostatine antilichaam een lichte keten-aminozuursequentie geselecteerd uit de groep bestaande uit SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 en 44. In andere uitvoeringsvormen, omvat de lichte keten de lichte keten- 25 aminozuursequentie van antilichaam 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21l; 2_112_1L-F58l; 2_112_1L-l85V of 2_112_1L-F58l, l85V. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de lichte keten van het humane anti-myostatine antilichaam de V_L-aminozuursequentie van antilichaam 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ 30 ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1

(SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); of 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) of genoemde aminozuursequentie hebbende tot en met 1, 2, 3, 4 of 5 conservatieve aminozuursubstitues en/of een totaal van tot en met 3 niet-conservatieve

5 aminozuursubstituties. In andere uitvoeringsvormen omvat de lichte keten van het humane anti-myostatine antilichaam de V_L-aminozuursequentie van antilichaam 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V of 2_112_1L-F58I, I85V. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de lichte keten de aminozuursequentie van het begin van de CDR1

10 tot het eind van CDR3 van een van de voorgaande antilichamen.

[0073] In sommige uitvoeringsvormen, kan de lichte keten de aminozuursequenties omvatten van CDR1, CDR2 en CDR3-regio's onafhankelijk geselecteerd uit de lichte keten CDR1, CDR2 en CDR3 regio's, respectievelijk, van twee of meer monoklonale antilichamen

15 geselecteerd uit 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); of 1_268_1 (SEQ ID NO: 32), of genoemde CDR regio's elk hebbende minder dan 3 of

20 minder dan 2 conservatieve aminozuursubstituties en/of een totaal van drie of minder niet-conservatieve aminozuursubstituties.

[0074] In bepaalde uitvoeringsvormen, omvat de lichte keten van het anti-myostatine antilichaam de aminozuursequenties van de lichte keten CDR1, CDR2 en CDR3 regio's van een antilichaam geselecteerd uit 1_116_1

25 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); of 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) of genoemde CDR regio's elk hebbende minder dan 3 of minder dan 2 conservatieve

aminezuursubstituties en/of een totaal van 3 of minder niet-conservatieve aminozuursubstituties.

[0075] Met betrekking tot de zware keten, in sommige uitvoeringsvormen, past het variabele domein(V_H) een humaan V_H 1-02, V_H 3-21 of V_H 3-23 gen toe. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de V_H sequentie van het anti-myostatine antilichaam een of meer aminozuursubstituties, -deleties of -inserties (addities) collectief "mutaties", in vergelijking met de stamlijn V_H aminozuursequentie. In sommige uitvoeringsvormen, omvat het variabele domein van de zware keten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 of 11 mutaties van de stamlijn V_H aminozuursequentie. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de mutatie(s) niet-conservatieve substituties vergeleken met de stamlijnaminezuursequentie. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de mutaties in de CDR regio's van de zware keten.

[0076] In sommige uitvoeringsvormen, zijn aminozuursubstituties op een of meer van dezelfde posities als de substituties van een stamlijn in een of meer van de V_H van antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. In andere uitvoeringsvormen, zijn de aminozuurveranderingen op een of meer van dezelfde posities maar omvatten een verschillende substitutie dan in het referentieantilichaam.

[0077] In sommige uitvoeringsvormen, omvat de zware keten een aminozuursequentie geselecteerd uit de groep bestaande uit SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 en 42. In andere uitvoeringsvormen, omvat de zware keten de zware ketenaminozuursequentie van antilichaam 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; of 2_112_1H-I12V. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de zware keten de V_H aminozuursequentie van antilichaam 1_116_1 (SEQ ID NO: 2), 1_136_3 (SEQ ID NO: 10), 1_257_1 (SEQ ID NO: 14), 1_46_1 (SEQ ID NO: 22), 2_112_1 (SEQ ID NO: 26),

- 1_314_1 (SEQ ID NO: 18), 1_66_1 (SEQ ID NO: 34), 2_43_1 (SEQ ID NO: 42), 2_177_1 (SEQ ID NO: 38), 1_132_1 (SEQ ID NO: 6) en 1_268_1 (SEQ ID NO: 30); of genoemde V_H aminozuursequentie hebbende tot 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 of 11 conservatieve aminozuursubstituties en/of een totaal van tot
- 5 en met 3 niet-conservatieve aminozuursubstituties. In andere uitvoeringsvormen, omvat de zware keten de V_H aminozuursequentie van antilichaam 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; of 2_112_1H-I12V. In sommige uitvoeringsvormen, omvat de zware keten de aminozuursequentie van het begin van de CDR1 tot het eind van de CDR3 van een van de
- 10 voorgaande antilichamen.
- [0078]** In sommige uitvoeringsvormen, omvat de zware keten de zware keten CDR1, CDR2 en CDR3 regio's van antilichaam 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-
- 15 L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V of genoemde CDR regio's elk hebbende minder dan 8, minder dan 6, minder dan 4, of minder dan 3 conservatieve aminozuursubstituties en/of een totaal van drie of minder niet-conservatieve aminozuursubstituties.
- 20 **[0079]** In sommige uitvoeringsvormen, zijn de zware keten CDR regio's onafhankelijk geselecteerd uit de CDR regio's van twee of meer antilichamen geselecteerd uit antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M;
- 25 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. In een andere uitvoeringsvorm, omvat het antilichaam een lichte keten zoals hierboven onthuld en een zware keten zoals boven onthuld. In een verdere uitvoeringsvorm, zijn de lichte ketens CDR's en de zware ketens CDR's van
- 30 het hetzelfde antilichaam.

[0080] In verschillende uitvoeringsvormen, hebben de anti-myostatine antilichamen de gehele lengte zware keten en de gehele lengte lichte keten aminozuursequentie(s), de V_H en V_L aminozuursequenties, de zware keten CDR1, CDR2 en CDR3 en lichte keten CDR1, CDR2 en CDR3

- 5 aminozuursequenties of de zware keten aminozuursequentie van het begin van de CDR1 tot het eind van de CDR3 en de lichte keten aminozuursequentie van het begin van de CDR1 tot het eind van de CDR3 van een anti-myostatine antilichaam hierin verschaft..

- [0081]** Een type van aminozuursubstitutie dat kan worden gemaakt is
 10 een of meer cysteïnes in het antilichaam te veranderen, welke chemisch reactief kan zijn, met een ander residu, zoals, zonder limitering, alanine of serine. In één uitvoeringsvorm, is er een substitutie van een niet-canonicaal cysteïne. De substitutie kan worden gemaakt in een CDR of frameworkregio van een variabel domein of in het constante domein van een antilichaam. In
 15 sommige uitvoeringsvormen, is het cysteïne canonicaal.

- [0082]** Een ander type van aminozuursubstitutie dat kan worden gemaakt is potentiële proteolytische plaatsen in het antilichaam te verwijderen. Zulke plaatsen kunnen optreden in een CDR of
 frameworkregio van een variabel domein of in het constante domein van
 20 antilichaam. Substitutie cysteïneresiduen en verwijdering van proteolytische plaatsen kan het risico op heterogeniteit in het antilichaamproduct verminderen en dus zijn homogeniteit verhogen. Een ander type van aminozuursubstitutie is asparagine-glycineparen te elimineren, welke potentiële deamidatieplaatsen vormen, door een of beide
 25 van de residuen te veranderen.

- [0083]** In sommige uitvoeringsvormen, is het C-terminale lysine van de zware keten van het anti-myostatine antilichaam van de uitvinding gekleefd. In verschillende uitvoeringsvormen van de uitvinding, kunnen de zware en lichte keten van de anti-myostatine antilichamen optioneel een
 30 signaalsequentie omvatten.

[0084] In een aspect, verschaft de uitvinding tot elf inhibitoire humane anti-myostatinemonoklonale antilichamen en de hybridomacellijnen die ze produceren. Tabel 1 somt op de sequentieidentifiers (SEQ ID NOs) van de nucleïnzuren coderende voor de gehele lengte zware en lichte ketens en
5 variabel domein omvattende gedeelten van deze ketens, en de corresponderende gehele lengte gededuceerde aminozuursequenties.

Tabel 1

Mab	SEQUENTIËLE IDENTIFIERS (SEQ ID NO)							
	GIFHDLLEIFNCHIE				AVIDOMUTIN- CYAUMERD			
	GIFHDLLEIFNCHIE				GIFHDLLEIFNCHIE			
	Zwarte		Lichte		Zwarte		Lichte	
	DNA	IEIWIIT	DNA	IEIWIIT	IEIWIIT	DNA	IEIWIIT	DNA
1_116_1	1	2	3	4	45	46	47	48
1_132_1	5	6	7	8	49	50	51	52
1_136_3	9	10	11	12	53	54	55	56
1_257_1	13	14	15	16	57	58	59	60
1_314_1	17	18	19	20	65	66	67	68
1_46_1	21	22	23	24	69	70	71	72
2_112_1	25	26	27	28	77	78	79	80
1_268_1	29	30	31	32	61	62	63	64
1_66_1	33	34	35	36	73	74	75	76
2_177_1	37	38	39	40	81	82	83	84
2_43_1	41	42	43	44	85	86	87	88

[0085] De uitvinding verschaft verder zware en/of lichte ketenvarianten van bepaalde van de boven opgesomde humane anti-myostatine antilichamen, omvattende een of meer aminozuurmodificaties. Om de varianten aan te duiden, is de eerste letter het eenlettersymbool voor het aminozuur van de natuurlijk voorkomende antilichaamketen, het nummer refereert aan de positie van het aminozuur (waarin positie 1 het N-terminale aminozuur is van de FRI) en de tweede letter is het eenlettersymbool voor de aminozuurvariant.

[0086] De uitvinding verschaft een lichte ketenvariant van monoklonaal antilichaam 1_116_1 genoemd 1_116_1L-Q45K, welke een lysine heeft op positie 45 van SEQ ID NO: 4.

[0087] Een andere lichte ketenvariant is 1_257_1L-L21I, welke een isoleucineresidu heeft op positie 21 van SEQ ID NO: 16.

[0088] Een zware ketenvariant van monoklonaal antilichaam van 1_314_1 genoemd 1_314_1H-T92A welke een alanineresidu heeft op positie 5 92 van SEQ ID NO: 18.

[0089] De uitvinding verschaft verder een zware ketenvariant van monoklonaal antilichaam 1_46_1 genoemd 1_46_1H-L81M, welke een methionine heeft op positie 81 van SEQ ID NO: 22.

[0090] De uitvinding verschaft een zware ketenvariant (I12V) en twee 10 lichte ketenvarianten (F58I en I85V) van monoklonaal antilichaam 2_112_1. De zware keten variant genoemd 2_112_1H-I12V heeft een valine op positie 12 van SEQ ID NO: 26. Een lichte ketenvariant, 2_112_1L-F85I, heeft een isoleucine op positie 85 van SEQ ID NO: 28. De andere lichte ketenvariant, genoemd 2_112_1L-I85V, heeft een valine op 15 positie 85 van SEQ ID NO: 28. De uitvinding verschaft ook een lichte ketenvariant omvattende beide mutaties, d.w.z., 2_112_1L-F85I, I85V. De uitvinding omvat ook antilichamen omvattende de zware ketenvariant met ofwel een of beide van de lichte ketenmutaties, d.w.z., 2_112_1H-I12V, L-F58I; 2_112_1H-I12V, L-I85V; en 2_112_1H-I12V, L-F58I, I85V.

20 [0091] In nog verdere uitvoeringsvormen, omvat de uitvinding antilichamen omvattende variabele domeinaminozuursequenties met meer dan 80%, meer dan 85%, meer dan 90%, meer dan 95%, meer dan 96%, meer dan 97%, meer dan 98% of meer dan 99% sequentie-identiteit aan een variabele domeinaminozuursequentie van een van de bovenopgesomde 25 humane anti-myostatine antilichamen.

Klasse en Subklasse van anti-myostatine antilichamen

[0092] De klasse en subklasse van anti-myostatine antilichamen kunnen worden gedetermineerd door een werkwijze bekend in de kunst. In het algemeen, kunnen de klasse en subklasse van een antilichaam worden

vastgesteld antilichamen toepassende die specifiek zijn voor een bepaalde klasse en subklasse van antilichaam. Zulke antilichamen zijn commercieel beschikbaar. De klasse en subklasse kunnen worden gedetermineerd door ELISA, of Western Blot zowel als andere technieken. Alternatief, kunnen

5 de klasse en subklasse worden gedetermineerd door geheel of een gedeelte van de constante domeinen van de zware en/of lichte ketens van antilichamen te sequencen, hun aminozuursequenties te vergelijken met de bekende aminozuursequenties van verschillende klasse en subklassen van immunoglobulinen, en bepalen van de klasse en subklasse van de

10 antilichamen.

[0093] In sommige uitvoeringsvormen, is het anti-myostatine-antilichaaam een monoklonaal antilichaam. Het anti-myostatine antilichaam kan een IgG, een IgM, een IgE, een IgA, of een IgD molecuul zijn. In een voorkeursuitvoering, is het anti-myostatine antilichaam een

15 IgG en is een IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 subklasse. In een andere voorkeursuitvoering, is het antilichaam subklasse IgG2.

Identificatie van Myostatine-epitopen herkend door anti-myostatine antilichamen

[0094] De uitvinding verschaft een humaan anti-myostatine monoklonaal

20 antilichaam dat bindt aan myostatine en wedijvert of kruiswedijvert met en/of hetzelfde epitoop bindt als (a) een antilichaam geselecteerd uit 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;

25 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; (b) een antilichaam dat een zware keten variabel domein omvat hebben met de aminozuursequentie van het V_H-domein in een van SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 of 85, (c) een antilichaam dat een lichte keten variabel domein omvat

hebbende de aminozuursequentie van het V_L domein in een van SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 of 87 (d) een antilichaam dat omvat zowel een zware keten variabel domein als gedefinieerd in (b) en een lichte keten variabel domein als gedefinieerd in (c).

[0095] Iemand kan vaststellen of een antilichaam bindt aan hetzelfde epitoom of kruiswedijvert voor binding met een anti-myostatine antilichaam door werkwijzen bekend in de kunst toe te passen. In een uitvoeringsvorm, staat iemand het anti-myostatine antilichaam van de uitvinding toe te binden aan myostatine onder verzadigende condities en meet dan de mogelijkheid van het testantilichaam om aan myostatine te binden. Als het testantilichaam in staat is te binden aan myostatine op de zelfde tijd als het referentie anti-myostatine antilichaam, dan bindt het testantilichaam aan een verschillend epitoom dan het referentie-anti-myostatine antilichaam. Echter, als het testantilichaam niet in staat is te binden aan myostatine op hetzelfde moment, dan bindt het testantilichaam aan hetzelfde epitoom, een overlappend epitoom, of een epitoom dat in dichte nabijheid is met het epitoom gebonden door het anti-myostatine antilichaam van de uitvinding. Het experiment kan worden uitgevoerd onder gebruikmaking van ELISA, RIA, BIACOR™, of flow-cytometrie. Om te testen of een anti-myostatine antilichaam kruiswedijvert met een ander anti-myostatine antilichaam, kan iemand de competitiewerkwijze toepassen zoals boven beschreven in twee richtingen, d.w.z. vaststellen of het bekende antilichaam test-antilichaam blokkeert en vice versa. In een voorkeursuitvoeringsvorm, wordt het experiment uitgevoerd ELISA toepassende.

Inhibitie van myostatineactiviteit door anti-myostatine antilichaam

[0096] Iemand kan anti-myostatine monoklonale antilichamen identificeren die myostatinebinding inhiberen een aantal assays

toepassende. Bijvoorbeeld, neutraliserende anti-myostatine antilichamen kunnen worden geïdentificeerd door hun mogelijkheid myostatine-geïnduceerde luciferase-activiteit in A204-cellen getransfecteerd met een Smad-respons elementen / luciferase construct te blokkeren zoals

- 5 beschreven in voorbeeld III. Geprefereerde anti-myostatine antilichamen hebben een IC_{50} van niet meer dan 500nM, 250nM, 100nM, 75nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 1nM, 0.5nM of 0.1nM.

[0097] Iemand kan ook de mogelijkheid van anti-myostatine antilichaam om myostatine-geïnduceerde Smad-eiwitactivatie te blokkeren

- 10 determineren door L6-rattenmyoblastcellen getransfecteerd met een Smad2/3-bindingselement/beta-lactamaseconstruct in contact te brengen met een anti-myostatine antilichaam zoals beschreven in voorbeeld IV. In verschillende uitvoeringsvormen, heeft het anti-myostatine antilichaam IC_{50} in deze assay van niet meer dan 500nM, 250nM, 100nM, 75nM, 50nM, 15 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 1nM, 0.5nM of 0.1nM.

[0098] Alternatief, kunnen neutraliserende anti-myostatine antilichamen worden geïdentificeerd door hun mogelijkheid Smad 2- of 3-fosforylatie te inhiberen in een Western Blot zoals beschreven in voorbeeld V.

- 20 **[0099]** In andere uitvoeringsvormen, moduleert een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding de expressie van genen geassocieerd met spiercelproliferatie en -differentiatie. Zulke modulatie omvat maar is niet beperkt tot afnemende expressie van de celcyclusinhibitor P21-eiwit en pro-apotopisch Bax-eiwit, toenemende fosforylering van Rb, en toenemende 25 expressie van Cdk2. In sommige uitvoeringsvormen, laten antagonist-anti-myostatine antilichamen van de uitvinding de expressie van MyoD, myogenine en Myf5 toenemen. Het effect van een anti-myostatine antilichaam op genexpressie kan worden vastgesteld toepassende een van een aantal van routinetechnieken. (Zie b.v., voorbeeld VI).

[0100] In sommige uitvoeringsvormen, versterkt een neutraliserend anti-myostatine antilichaam van de uitvinding myoblastdifferentiatie. De mogelijkheid van een antilichaam zulke proliferatie en differentiatie te versterken kan worden vastgesteld door assays toepassende, b.v. C2C12-
 5 cellen zoals beschreven in voorbeeld VII.

Competatieve vs non-competatieve humane anti-myostatine antilichamen

[0101] Humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding kunnen worden gecategoriseerd als competitief en niet-competitief met andere inhibitoire myostatienebindende eiwitten immunoprecipitatie-
 10 experimenten toepassende. Bijvoorbeeld, het propeptide, welke een complex vormt met matuur GDF8 is een inhibitoir eiwit. Geconditioneerd medium van 293T-cellen GDF8 tot expressie brengende omvat matuur GDF8, matuur GDF8/propeptidecomplex en niet-geprocessed GDF8. Immunoprecipitatiestudies werden uitgevoerd om te testen de binding van
 15 de humane anti-myostatine antilichamen in de uitvinding aan matuur GDF8/propeptidecomplex dit geconditioneerde medium toepassende. Zoals beschreven in voorbeeld X, bonden en immunoprecipiteerden antilichamen 2_112_1, 2_43_1 en 2_177_1 matuur GDF8, matuur GDF8/propeptidecomplex, en niet-geprocessed GDF8. Antilichaam 1_66_1
 20 bond en immunoprecipiteerde matuur GDF8 en matuur GDF8/propeptidecomplex. Geen van de andere antilichamen immunoprecipiteerde matuur GDF8, propeptide, of niet-geprocessed GDF8. Antilichamen 2_112_1, 2_43_1 en 2_177_1, dus, zijn niet-competatieve antilichamen, en antilichaam 1_66_1 is ook een niet-competitief
 25 antilichaam maar een die bindt aan een verschillend epitoom van myostatine. Een niet-competitief neutraliserend antilichaam, d.w.z. een die myostatine bindt in de aanwezigheid van andere inhibitoire eiwitten, zal een betere effectiviteit hebben in vivo dan een competitief antilichaam.

[0102] In andere uitvoeringsvormen, immunoprecipiteert een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding matuur GDF8 uit muizenserum. Zoals beschreven in voorbeeld XI, trekken monoklonale antilichamen 2_112, 2_43_1 en 2_177 meer matuur GDF8 neer dan 1_116_1 en 1_66_1.

5 Soort specificiteit en moleculaire selectiviteit

- [0103] In een ander aspect van de uitvinding, demonstreren de anti-myostatine antilichamen zowel soort specificiteit als moleculaire selectiviteit. In sommige uitvoeringsvormen, bindt het anti-myostatine antilichaam aan humaan-, muis-, *Rattus norvegicus* (Noorwegenrat)-, 10 *Cynomolgus macaque* (aap)-, *Macaca fascicularis* (krab-etende macaak)-, *Meleagris gallopavo* (kalkoen)-, *Sus scrofa* (varken)-, *Gallus gallus* (kip)-, *Gallus gallus* (kip)-, *Canis familiaris* (hond)-, *Equus caballus* (paard)-, *Coturnix chinensis* (kwartel)-, *Coturnix coturnix* (gewone kwartel)- en *Columba livia* (gedomesticeerde duif)-myostatine. De lessen van de 15 beschrijving volgende, kan iemand vaststellen de soort specificiteit voor het anti-myostatine antilichaam goed bekende werkwijzen in de kunst toepassende. Bijvoorbeeld, kan iemand de soort specificiteit vaststellen Western blot, surface plasmon resonantie, b.v. BIAcore, ELISA, immunoprecipitatie of RIA toepassende.
- 20 [0104] In andere uitvoeringsvormen, heeft het anti-myostatine antilichaam een selectiviteit voor myostatine over GDF11 van ten minste 50-maal of ten minste 100-maal. GDF11 is een dichtbij familielid van myostatine dat 90% identiteit deelt in zijn mature eiwit. In sommige uitvoeringsvormen, toont het anti-myostatine antilichaam geen 25 waarneembare specifieke binding aan een ander eiwit anders dan myostatine. Iemand kan de selectiviteit van het anti-myostatine antilichaam voor myostatine vaststellen werkwijzen goed bekend in de kunst toepassende de lessen van de beschrijving volgende. Bijvoorbeeld kan

iemand de selectiviteit vaststellen toepassende Western blot, flow-cytometrie, ELISA, immunoprecipitatie of RIA.

- [0105] In andere uitvoeringsvormen van de uitvinding, heeft het anti-myostatine antilichaam niet deze hoge graad van selectiviteit voor GDF8
5 over GDF11.

Werkwijzen voor het produceren van antilichamen en antilichaamproducerende cellijnen

Immunisatie

- [0106] In sommige uitvoeringsvormen, worden humane antilichamen
10 geproduceerd door immunisatie van een niet-humaan, transgeen dier omvattende binnen zijn genoom enige of alle van humane immunoglobuline zware keten en lichte keten loci binnen een myostatineantigeen. In een voorkeursuitvoering, is het niet humane dier een XENOMOUSE™ dier. (Abgenix, Inc., Fremont, CA).

- 15 [0107] XENOMOUSE™ -muizen zijn ontworpen muisstammen die grote fragmenten van humane immunoglobuline zware keten en lichte keten loci omvatten en zijn deficiënt in muizenantilichaamproductie. Zie, b.v., Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) en V.S. Octrooien 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598, 6,130,364,
20 6,162,963 en 6,150,584. Zie ook WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, en WO 00/037504.

- [0108] Een ander aspect, verschaft de uitvinding een werkwijze voor het
25 maken van anti-myostatine antilichamen van niet-humane, niet-muisdieren door immunisatie van niet-humane transgene dieren die humane immunoglobulineloci omvatten binnen een myostatineantigeen, omvatten. Iemand kan zulke dieren produceren toepassende de werkwijzen beschreven in de boven geciteerde documenten. De werkwijzen beschreven

in deze documenten kunnen worden gemodificeerd zoals beschreven in V.S. Octrooi 5,994,619, welke hierbij wordt opgenomen door referentie. U.S. Octrooi 5,994,619 beschrijft werkwijzen voor het produceren van nieuwe gekweekte binnenste celmassa (CICM)-cellen en cellijnen, verkregen van
 5 varkens en koeien, en transgene CICM-cellen waarin heteroloog DNA ingebracht is. CICM-transgene cellen kunnen worden toegepast om gekloonde transgene embryo's, foetussen, en nageslacht te produceren. Het '619-Octrooi beschrijft ook werkwijzen van productie van transgene dieren die in staat zijn het heterologe DNA aan hun nageslacht over te dragen. In
 10 voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding, zijn de niet-humane dieren zoogdieren, in het bijzonder ratten, schapen, varkens, geiten, vee, paarden of kippen.

[0109] XENOMOUSE™ -muizen produceren een volwassenachtige humaan repertoire van geheel humane antilichamen en genereren
 15 antigeenspecifieke humane antilichamen. In sommige uitvoeringsvormen, omvatten XENOMOUSE™ -muizen ongeveer 80% van het humane antilichaam V-genrepertoire door introductie van megabasegrote, stamlijnconfiguratiefragmenten van de humane zware keten loci en kappa-lichte keten loci in gist artificieel chromosoom (YAC). In andere
 20 uitvoeringsvormen, omvatten XENOMOUSE™ -muizen verder ongeveer geheel het humane lambda lichte ketenlocus. Zie Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green en Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), en WO 98/24893, de beschrijvingen welke hierbij zijn opgenomen door referentie..

[0110] In sommige uitvoeringsvormen, zijn het niet-humane dier omvattende humane immunoglobulinegenen, dieren die een humaan immunoglobuline "minolocus" hebben. In de minilocusbenadering, is een exogeen Ig locus nagebootst door de inclusie van individuele genen van het Ig locus. Dus, een of meer V_H genen, een of meer D_H genen, een of meer J_H
 30 genen, een mu constant domein, en een tweede constant domein (bij

voorkeur een gamma-constant domein) worden gevormd in een construct voor invoeging in een dier. Deze benadering wordt beschreven, o.a. in V.S. Octrooi Nrs. 5,545,807, 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,591,669, 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215, en 5,643,763, hierbij opgenomen door referentie.

[0111] In een ander aspect, verschaft de uitvinding een werkwijze voor maken van gehumaniseerde anti-myostatine antilichamen. In sommige uitvoeringsvormen, worden niet-humane dieren geïmmuniseerd met een myostatineantigeen zoals beneden beschreven onder condities die antilichaamproductie toestaan. Antilichaamproducerende cellen worden geïsoleerd uit de dieren, en nucleïnezuren coderende voor de zware en lichte keten van een anti-myostatine antilichaam van interesse worden geïsoleerd uit de geïsoleerde antilichaamproducerende cellen of uit een geïmmortaliseerde cellijn geproduceerd uit zulke cellen. De nucleïnezuren worden vervolgens ontworpen technieken toepassende bekend aan dezen vaardig in de kunst en zoals verder beneden beschreven om de hoeveelheid van niet-humane sequentie te reduceren, d.w.z., het antilichaam te humaniseren om de immuunrespons in mensen te reduceren.

[0112] In sommige uitvoeringsvormen, is het myostatineantigeen geïsoleerd en/of gezuiverd myostatine. In sommige uitvoeringsvormen, is het myostatineantigeen humaan myostatine. Echter, omdat het C-terminale mature myostatine uit mensen, muizen, rat, hond, kwartel, kip, kalkoen, varken, paard en apen identiek is en niet geglycosyleerd is in cellen, kan myostatine van deze soorten en andere soorten met dezelfde mature eiwitsequentie ook worden toegepast als het immunogeen. In andere uitvoeringsvormen, is het myostatineantigeen een cel dat myostatine tot uitdrukking brengt of overexpresseert. In andere uitvoeringsvormen, is het myostatinantigeen een recombinant eiwit tot uitdrukking gebracht uit gist, insectencellen, bacteriën zoals E.Coli, of andere bronnen door recombinante technologie.

- [0113] Immunisatie van dieren kan door een werkwijze bekend in de kunst. Zie, b.v., Harlow en Lane, Antilichamen: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Werkwijzen voor immunisatie van niet-humane dieren, zoals muizen, ratten, schapen, geiten, varkens, vee en paarden zijn goed bekend in de kunst. Zie, b.v. Harlow en Lane, 5 bovenstaand, en U.S. Octrooi 5,994,619. In een voorkeursuitvoering, wordt het myostatineantigeen toegediend met een adjuvans om de immuunrespons te stimuleren. Voorbeeldadjuvantia omvatten compleet of incompleet Freund's adjuvans, RIBI (muramyldipeptiden) of ISCOM 10 (immuunstimulerende complexen). Zulke adjuvantie kunnen het polypeptide beschermen tegen snelle verspreiding door te sequesteren in een lokaal depot, of zij kunnen substanties omvatten die de gastheer stimuleren om factoren uit te scheiden die chemotactisch zijn voor macrofagen en andere componenten van het immuunsysteem. Bij voorkeur, 15 als een polypeptide wordt toegediend, zal het immunisatieschema twee of meer toedieningen van het polypeptide omvatten, uitgespreid over verscheidene weken. Voorbeeld I illustreert een werkwijze voor productie van anti-myostatine monoklonale antilichamen in XenoMouse™-muizen.

Productie van Antilichamen en antilichaamproducerende cellijnen

- 20 [0114] Na immunisatie van een dier met een myostatineantigeen, kunnen antilichamen en/of antilichaamproducerende cellen worden verkregen uit het dier. In sommige uitvoeringsvormen, wordt anti-myostatine antilichaam-bevattend serum verkregen van het dier door het dier te laten bloeden of op te offeren. Het serum kan worden toegepast zoals het is 25 verkregen van het dier, een immunoglobulinefractie kan worden verkregen uit het serum, of de anti-myostatine antilichamen kunnen worden gezuiverd uit het serum.

[0115] In sommige uitvoeringsvormen, worden antilichaam-producerende cellijnen bereid uit cellen geïsoleerd uit het geïmmuniseerde dier. Na

immunisatie, wordt het dier opgeofferd en lymfeknoop en/of milt B-cellen worden onsterfelijk gemaakt door een middel bekend in de kunst.

Werkwijzen van immortaliseren van cellen omvatten, maar zijn niet

beperkt tot, ze te transfecteren met oncogenen, ze te infecteren met een

- 5 oncogeen virus en ze te kweken onder condities die selecteren voor het immortaliseren van cellen, ze te onderwerpen aan carcinogene of muterende verbindingen, ze te fuseren met een geïmmortaliseerde cel, b.v., een myelomacel, en een tumorsuppressorgen te inactiveren. Zie, b.v., Harlow en Lane, bovenstaand. Als fusie met myelomacellen wordt

- 10 toegepast, scheiden de myelomacellen bij voorkeur geen immunoglobulinepolypeptiden uit (een niet-uitscheidende cellijn).

Geïmmortaliseerde cellen worden gescreend myostatine toepassende, of een gedeelte daarvan. In een voorkeursuitvoering, wordt de initiële screening

- 15 uitgevoerd toepassende een enzymlinked immunoassay (ELISA) of een radioimmunoassay. Een voorbeeld van ELISA-screening wordt verschaft in WO 00/37504, hierin opgenomen door referentie..

[0116] Anti-myostatine antilichaam-producerende cellen, b.v., hybridoma's worden geselecteerd, gekloneerd en verder gescreend voor gewenste eigenschappen, inclusief robuuste groei, hoge

- 20 antilichaamproductie en gewenste antilichaameigenschappen, zoals verder beneden beschreven. Hybridoma's kunnen worden geëxpandeerd in vivo in syngenetische dieren, in dieren die een immuunsysteem missen, b.v., naakte muizen, of in celkweek in vitro. Werkwijzen van selecteren, kloneren en expanderen van hybridoma's zijn goed bekend aan deze van
- 25 normale vaardigheid in de kunst.

[0117] In een voorkeursuitvoering, is het geïmmuniseerde dier een niet-humaan dier dat humane immunoglobulinegenen tot expressie brengt en de milt B-cellen worden gefuseerd met een myelomacellijn van dezelfde soort als het niet-humane dier. In een meer geprefereerd uitvoeringsvorm, is het

- 30 geïmmuniseerde dier een XENOMOUSE™ -muis en is de myelomacellijn

een niet-secreterende muismyeloma. In een zelfs meer geprefereerde uitvoeringsvorm, is de myelomacellijn P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Zie, b.v., Voorbeeld I.

[0118] Dus, in één uitvoeringsvorm, verschaft de uitvinding werkwijzen
 5 voor het produceren van een cellijn die een humaan monoklonaal antilichaam of een fragment daarvan produceert gericht tegen myostatine omvattende (a) immunisatie van een niet-humaan transgeen dier beschreven hierin met myostatine, een gedeelte van myostatine of een cel of weefsel myostatine tot expressie brengende; (b) het transgene dier toestaan
 10 een immuunrespons op te bouwen tegen myostatine; (c) het isoleren van antilichaamproducerende cellen van een transgeen dier; (d) het immortaliseren van antilichaamproducerende cellen; (e) het creëren van individuele monoklonale populaties van de geïmmortaliseerde antilichaamproducerende cellen; en (f) het screenen van de
 15 geïmmortaliseerde antilichaamproducerende cellen om een antilichaam gericht tegen myostatine te identificeren.

[0119] In een ander aspect, verschaft de uitvinding een cellijn die een humaan anti-myostatine antilichaam produceert. In sommige uitvoeringsvormen, is de cellijn een hybridomacellijn. In sommige
 20 uitvoeringsvormen, zijn de hybridoma's muishybridoma's, zoals boven beschreven. In andere uitvoeringsvormen, worden de hybridoma's geproduceerd in een niet-humaan, niet-muizensoort zoals ratten, schapen, varkens, geiten, vee of paarden. In een andere uitvoeringsvorm, zijn de hybridoma's humane hybridoma's.

25 [0120] In een andere uitvoeringsvorm, wordt een transgeen dier geïmmuniseerd met een myostatineantigeen, primaire cellen, bijvoorbeeld, milt of perifere bloed B-cellen, worden geïsoleerd uit een geïmmuniseerd transgeen dier en individuele cellen die antilichamen produceren specifiek voor het gewenste antigeen worden geïdentificeerd. Polygeadenyleerd
 30 mRNA uit elke individuele cel wordt geïsoleerd en reverse transcription

polymerase chain reaction (RT-PCR) wordt uitgevoerd sense primers
toepassende die gloeien tegen variabele domeinsequenties, b.v.,
gedegenereerde primers die meest of alle van de FR1-regio's van humane
zware en lichte keten variabele domein genen herkennen en
5 antigeenprimers die gloeien tegen constante of aansluitende
regiosequenties. cDNAs van de zware en lichte keten variabele domeinen
worden dan gekloond en tot expressie gebracht in een geschikte gastheercel,
.b.v, een myelomacel, als chimere antilichamen met respectievelijke
immunoglobuline constante regio's, zoals de zware keten en κ - of λ -
10 constante domeinen. Zie Babcook, J.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
93:7843-48, 1996, hierin opgenomen door referentie. Anti-myostatine
antilichamen kunnen dan worden geïdentificeerd en geïsoleerd zoals hierin
beschreven.

[0121] In een ander uitvoeringsvorm, kunnen faag display-technieken
15 worden toegepast om bibliotheken te verschaffen omvattende een repertoire
van antilichamen met verschillende affiniteiten voor myostatine. Voor
productie van zulke repertoiren, is het onnodig de B-cellen uit het
geïmmuniseerde dier te immortaliseren. Eerder, kunnen de primaire B-
cellen direct worden toegepast als een bron van mRNA. Het mengsel van
20 cDNA's verkregen uit B-cel, b.v., verkregen uit milten, wordt toegepast om
een expressiebibliotheek te bereiden, bijvoorbeeld, een faag display-
bibliotheek getransfecteerd in *E.coli*. De resulterende cellen worden getest
voor immunoreactiviteit voor myostatine. Technieken voor de identificatie
van hoog affiniteit humane antilichamen uit zulke bibliotheken worden
25 beschreven door Griffiths et al., *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994); Nissim
et al., *ibid*, blz. 692-698 en by Griffiths et al., *ibid*, 12:725-734, welke
opgenomen zijn door referentie. Uiteindelijk, worden klonen uit de
bibliotheek geïdentificeerd die bindingsaffiniteiten produceren van een
gewenste grootte voor het antigeen en het DNA coderende voor het product
30 verantwoordelijk voor zulke binding wordt teruggewonnen en

gemanipuleerd voor standaard recombinante expressie. Faag display-bibliotheken kunnen ook worden geconstrueerd toepassende eerder gemanipuleerde nucleotidesequenties en gescreend op een vergelijkbare manier. In het algemeen, worden de cDNA's coderende voor zware en lichte ketens onafhankelijk verschaft of verbonden om Fv-analogen te vormen voor productie in de faag-bibliotheek.

[0122] De faag-bibliotheek wordt dan gescreend voor de antilichamen met de hoogste affiniteiten voor myostatine en het genetisch materiaal teruggewonnen uit de geschikte kloon. Verdere ronden van screening kunnen affiniteit vergroten van het origineel geïsoleerde antilichaam.

Nucleïnezuren, vectoren, gastheercellen en

Recombinante Werkwijzen voor het maken van Antilichamen

Nucleïnezuren

[0123] De onderhavige uitvinding omvat ook nucleïnezuurmoleculen coderende voor anti-myostatine antilichamen of antigeenbindende fragmenten daarvan. In sommige uitvoeringsvormen, coderen verschillen nucleïnezuurmoleculen voor een zware keten en een lichte keten van een anti-myostatine-immunoglobuline. In andere uitvoeringsvormen, codeert hetzelfde nucleïnezuurmolecuul voor een zware keten en een lichte keten van een anti-myostatine-immunoglobuline.

[0124] In sommige uitvoeringsvormen, past het nucleïnezuurmolecuul coderende voor het variabele domein van de lichte keten (V_L) een humaan A3, A30 of L2 V_k gen, en een humaan Jk1, Jk3 of Jk4 gen toe. In sommige uitvoeringsvormen past het nucleïnezuurmolecuul een humaan A30, A3 of L2 V_k gen en een humaan Jk4 gen toe. In andere uitvoeringsvormen, past het nucleïnezuurmolecuul een humaan A30, A3 of L2 gen en een humaan Jk1 gen toe. In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul coderende voor de lichte keten voor een

aminozuursequentie omvattende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, of 10 substituties uit de stamlijn aminozuursequentie(s). In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul een nucleotidesequentie die codeert voor een V_L aminozuursequentie omvattende 1, 2, 3, 4 of 5 conservatieve

- 5 aminozuursubstituties en/of 1, 2, of 3 niet-conservatieve substituties vergeleken met stamlijn V_K en J_K sequenties. Substituties kunnen zijn in de CDR-regio's, de frameworkregio's of in het constante domein.

- [0125] In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor een V_L aminozuursequentie omvattende een of meer mutaties
- 10 vergeleken met de stamlijnsequentie die identiek zijn aan de mutaties uit stamlijn gevonden in de V_L van een van antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M,
- 15 L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

- [0126] In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor ten minste drie aminozuursubstituties vergeleken met de stamlijnsequentie gevonden in de V_L van een van de antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1,
- 20 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

- [0127] In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuur molecuul
- 25 een nucleotidesequentie die codeert voor de V_L aminozuursequentie van monoclonal antilichaam 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20--); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 28); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); of
- 30 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) of een variant of gedeelte daarvan. In sommige

uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor een aminozuursequentie omvattende de lichte keten CDR's van een van genoemde boven opgesomde antilichamen. In sommige uitvoeringsvormen, is genoemd gedeelte een aangrenzend gedeelte omvattende CDR1-CDR3.

- 5 **[0128]** In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul een nucleotidesequentie die codeert voor de aminozuursequentie van een van de SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 of 87. In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul de nucleotidesequente van SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 15, 10 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 48, 52, 56, 60, 68, 72, 80, 64, 76, 84 of 88 of een gedeelte daarvan. In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuur voor de aminozuursequentie van de lichte keten of een, twee of alle drie CDR's van genoemd antilichaam. In sommige uitvoeringsvormen, codeert genoemd gedeelte voor een aangrenzende regio van CDR1-CDR3 van de 15 lichte keten van een anti-myostatine antilichaam.

- [0129]** In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor een V_L aminozuursequentie die ten minste 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% of 99% identiek is aan de V_L aminozuursequentie van een van antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 20 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V, of aan de aminozuursequentie van de V_L regio van een van SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 25 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 of 87. Nucleïnezuurmoleculen van de uitvinding omvatten nucleïnezuren die onder hoog stringente condities hybridiseren, zoals deze boven beschreven, of die ten minste 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% of 99% identiek zijn aan een nucleïnezuur coderende voor de aminozuursequentie de V_L regio van SEQ ID NOs: 4, 8, 30 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 of 87 of

aan een nucleïnezuur omvattende de V_L regio nucleotidesequentie van SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 48, 52, 56, 60, 68, 72, 80, 64, 76, 84 of 88

[0130] In andere geprefereerde uitvoeringsvormen codeert het
 5 nucleïnezuurmolecuul voor het variabele domein van een zware keten (V_H) dat toepast een humane 1-02, 3-21 of 3-23 V_H gensequentie of een sequentie daarvan verkregen. In verschillende uitvoeringsvormen, benut het nucleïnezuurmolecuul een humaan V_H 1-02 gen, een D4-23 gen en een humaan J_H6b gen; een humaan V_H 3-21 gen, een humaan D3-16 of D5-12
 10 gen en een humaan J_H6b gen; een humaan V_H 3-21 gen, een humaan D1-26 of D5-5 gen en een humaan J_H4b gen; een humaan V_H 3-23 gen, een humaan D1-7 gen en een humaan J_H3b gen.

[0131] In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor een aminozuursequentie omvattende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 of 11
 15 mutaties vergeleken met de stamlijn aminozuursequentie van de humane V, D of J genen. In sommige uitvoeringsvormen, zijn genoemde mutaties in de V_H regio. In sommige uitvoeringsvormen, zijn genoemde mutaties in de CDR regio's.

[0132] In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul
 20 voor een V_H sequentie omvattende een of meer aminozuurmutaties vergeleken met de stamlijn V_H sequentie die identiek zijn aminozuurmutaties gevonden in de V_H van monoklonaal antilichaam 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuur voor ten minste drie aminozuurmutaties vergeleken met de stamlijnsequenties die identiek zijn aan ten minste drie aminozuurmutaties gevonden in een
 30 van de bovenopgesomde monoklonale antilichamen.

- [0133] In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul een nucleotidesequentie die codeert voor ten minste een gedeelte van de V_H aminozuursequentie van een monoklonaal antilichaam geselecteerd uit 1_116_1 (SEQ ID NO: 2); 1_136_3 (SEQ ID NO: 10); 1_257_1 (SEQ ID NO: 14); 1_46_1 (SEQ ID NO: 22); 2_112_1 (SEQ ID NO: 26); 1_314_1 (SEQ ID NO: 18); 1_66_1 (SEQ ID NO: 34); 2_43_1 (SEQ ID NO: 42); 2_177_1 (SEQ ID NO: 38); 1_132_1 (SEQ ID NO: 6); of 1_268_1 (SEQ ID NO: 30), een variant daarvan, of genoemde sequentie hebbende conservatieve aminozuurmutaties en/of een totaal van drie of minder niet-conservatieve aminozuursubstituties. In verschillende uitvoeringsvormen codeert de sequentie voor een of meer CDR regio's, bij voorkeur een CDR3 regio, alle drie CDR regio's, een aangrenzend gedeelte omvattende CDR1-CDR3, of de gehele V_H regio, van een boven opgesomd anti-myostatine antilichaam.
- [0134] In sommige uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul een nucleotidesequentie die codeert voor de aminozuursequentie van een van de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 of 85. In verschillende geprefereerde uitvoeringsvormen, omvat het nucleïnezuurmolecuul ten minste een gedeelte van de nucleotidesequentie van SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82 of 86. In sommige uitvoeringsvormen, codeert genoemd gedeelte voor de V_H regio, een CDR3 regio, alle drie CDR regio's, of een aangrenzende regio omvattende CDR1-CDR3.
- [0135] In sommige uitvoeringsvormen, codeert het nucleïnezuurmolecuul voor een V_H aminozuursequentie die ten minste 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% of 99% identiek aan de V_H aminozuursequentie in een van SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 of 85. Nucleïnezuurmoleculen van de uitvinding omvatten nucleïnezuren die onder hoog stringente condities hybridiseren, zoals deze boven beschreven, of die ten minste 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% of 99% identiek zijn aan een nucleïnezuur coderende voor de

aminozuursequentie van SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 of 42 of aan een V_H regio daarvan, of aan een nucleïnezuur omvattende de nucleotidesequentie van SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 of 41 of de nucleotidesequentie die codeert voor een V_H regio daarvan.

- 5 **[0136]** In een andere uitvoeringsvorm, codeert het nucleïnezuur voor een gehele lengte-zware keten van een antilichaam geselecteerd uit 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V;
- 10 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V, of een zware keten omvattende de aminozuursequentie van SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 of 42. Verder, mag het nucleïnezuur omvatten de nucleotidesequentie van SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 of 41.
- 15 **[0137]** Een nucleïnezuurmolecuul coderende voor de zware of lichte keten van een anti-myostatine antilichaam of gedeelten daarvan kan worden geïsoleerd uit elke bron die zo'n antilichaam produceert. In verschillende uitvoeringsvormen, worden de nucleïnezuurmoleculen geïsoleerd uit een B-cel die een anti-myostatine antilichaam tot uitdrukking brengt geïsoleerd
- 20 uit een dier geïmmuniseerd met myostatine of uit een geïmmortaliseerde cel verkregen uit zo'n B-cel. Werkwijzen van isolatie van nucleïnezuren coderende voor een antilichaam zijn goed bekend in de kunst. Zie b.v., Sambrook et al. mRNA kan worden geïsoleerd en toegepast om cDNA te produceren voor toepassing in de polymerase chain reaction (PCR) of cDNA
- 25 clonering van antilichaamgenen. In een voorkeursuitvoering, wordt het nucleïnezuurmolecuul geïsoleerd uit een hybridoma dat heeft als een van zijn fusiepartners een cel uit een niet-humaan transgeen dier, genoemde cel een humaan immunoglobuline producerende. In een zelfs meer
- 30 geprefereerde uitvoeringsvorm, wordt de cel humaan immunoglobuline producerende, geïsoleerd uit een XENOMOUSE™ -dier. In een andere

uitvoeringsvorm, wordt de cel het humane immunoglobuline producerende geïsoleerd uit een niet-human, niet-muis transgeen dier, zoals boven beschreven. In een andere uitvoeringsvorm, wordt het nucleïnezuur geïsoleerd uit een niet-humaan, niet-transgeen dier. De

- 5 nucleïnezuurmoleculen geïsoleerd uit een niet-humaan, niet-transgeen dier kan worden toegepast, b.v., voor gehumaniseerde antilichamen die een of meer aminozuursequenties uit een humaan anti-myostatine antilichaam van de onderhavige uitvinding omvatten.

- [0138] In sommige uitvoeringsvormen, kan een nucleïnezuur coderende
10 voor een zware keten of een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding een nucleotidesequentie coderende voor een V_H domein van de uitvinding verbonden in-frame aan een nucleotidesequentie coderende voor een zware keten-constant domein uit elke bron omvatten. Vergelijkbaar, kan een nucleïnezuurmolecuul coderende voor een lichte keten van een anti-
15 myostatine antilichaam van de uitvinding een nucleotidesequentie omvatten coderende voor een V_L domein van de uitvinding verbonden in frame aan een nucleotidesequentie coderende voor een lichte keten-constant domein uit elke bron.

- [0139] In een verder aspect van de uitvinding, worden
20 nucleïnezuurmolecuul coderende voor het variabele domein van de zware (V_H) en/of lichte (V_L) ketens "geconverteerd" naar gehele-lengte antilichaamgenen. In één uitvoeringsvorm, worden nucleïnezuurmoleculen coderende voor de V_H of V_L domeinen geconverteerd tot gehele-lengte antilichaamgenen door insertie in een expressievector reeds coderende voor
25 zware keten-constante (C_H) of lichte keten-constante (C_L) domeinen, respectievelijk, zodat het V_H segment operatief wordt verbonden aan de C_H segment(en) binnen de vector, en/of het V_L segment wordt operatief verbonden aan het C_L segment binnen de vector. In een andere uitvoeringsvorm, worden nucleïnezuurmoleculen coderende voor de V_H en/of
30 V_L domeinen geconverteerd in geheel-lengte antilichaamgenen door

verbinding, bijv, ligatie, van een nucleïnezuurmolecuul coderende voor een V_H en/of V_L domeinen en een nucleïnezuurmolecuul coderende voor een C_H en/of C_L domein standaard moleculaire biologische technieken toepassende. Nucleïnezuursequenties van humane zware en lichte keten-

- 5 immunoglobuline constante domein genen zijn bekend in de kunst. Zie, b.v., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5deEd., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Nucleïnezuurmoleculen coderende voor de gehele lengte zware en/of lichte ketens kunnen dan tot expressie worden gebracht uit een cel waarin zij geïntroduceerd zijn en het anti-myostatine
- 10 antilichaam kan worden geïsoleerd.

[0140] De nucleïnezuurmoleculen kunnen worden toegepast om recombinant grote hoeveelheden van anti-myostatine antilichamen tot expressie te brengen. De nucleïnezuurmoleculen kunnen ook worden toegepast om chimere antilichamen, bispecifieke antilichamen, enkele

15 keten-antilichamen, immunoadhesinen, diabodies, gemuteerde antilichamen en antilichaamderivaten, te produceren, zoals verder beneden beschreven. Als nucleïnezuurmoleculen zijn verkregen uit een niet-humaan, niet-transgeen dier, kunnen de nucleïnezuurmoleculen worden toegepast voor antilichaamhumanisatie, zoals beneden beschreven.

- 20 [0141] In een andere uitvoeringsvorm, wordt een nucleïnezuurmolecuul van de uitvinding toegepast als een probe of PCR-primer voor een specifieke antilichaamsequentie. Bijvoorbeeld, kan het nucleïnezuur worden toegepast als een probe in diagnostische werkwijzen of als een PCR-primer om regio's van DNA die toegepast zouden kunnen worden te amplificeren, onder
- 25 andere, om te isoleren additionele nucleïnezuurmoleculen coderende voor variabele domeinen van anti-myostatine antilichamen. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de nucleïnezuurmoleculen oligonucleotiden. In sommige uitvoeringsvormen, zijn de nucleotiden uit hoog variabele domeinen van de zware en licht keten van het antilichaam van interesse. In
- 30 sommige uitvoeringsvormen, coderen oligonucleotiden geheel of een

gedeelte van een of meer van de CDR's van antilichamen 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, 5 L-F58I; of 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V of varianten daarvan zoals hierin beschreven.

Vectoren

[0142] De uitvinding verschaft vectoren omvattende nucleïnezuurmoleculen die coderen voor de zware keten van een anti-
10 myostatine antilichaam van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan. De uitvinding verschaft ook vectoren omvattende nucleïnezuurmoleculen die coderen voor de lichte keten van zulke antilichamen of antigeenbindend gedeelte daarvan. De uitvinding verschaft verder vectoren omvattende nucleïnezuurmoleculen coderende
15 voor fusie-eiwitten, gemodificeerde antilichamen, antilichaamfragmenten, en probes daarvan.

[0143] In sommige uitvoeringsvormen, worden de anti-myostatine antilichamen van de uitvinding of antigeenbindende gedeelten daarvan tot uitdrukking gebracht door DNA's in te voegen coderende voor gedeeltelijk of
20 gehele lengte lichte en zware ketens, verkregen zoals boven beschreven, in expressievectoren zodat de genen operatief worden verbonden aan noodzakelijke expressie controlesequenties zoals transcriptionele en translationele controlesequenties. Expresievectoren omvatten plasmiden, retrovirussen, adenovirussen, adenogeassocieerde virussen (AAV),
25 plantenvirussen, zoals bloemkoolmozaiekvirus, tabakmozaiekvirus, cosmiden, YAC's, EBV-verkregen episomen, en dergelijke. Het antilichaamgen wordt geligeerd in een vector zodat transcriptionele en translationele controlesequenties binnen de vector hun bedoelde functie dienen van regulering van de transcriptie en translatie van het

antilichaamgen. De expressievector en expressie controlesequenties worden gekozen om compatibel te zijn met de toegepaste expressiegastheer cel. Het antilichaam lichte keten gen en het antilichaam zware keten gen kunnen worden ingevoegd in afzonderlijke vectoren. In een voorkeursuitvoering, worden beide genen ingevoegd in dezelfde expressievector. De antilichaamgenen worden ingevoegd in de expressievector door standaardwerkwijzen (b.v., ligatie van complementaire restrictieplaatsen op het antilichaam gen fragment en vector, of stomp-einde-ligatie als geen restrictieplaatsen aanwezig zijn).

- 10 **[0144]** Een gemakkelijke vector is een die codeert voor een functioneel compleet humane C_H of C_L immunoglobulinesequentie, met geschikte restrictieplaatsen zo ontworpen dat een V_H of V_L sequentie gemakkelijk kan worden ingevoegd en tot uitdrukking gebracht, zoals boven beschreven. In zulke vectoren, treedt splicing gebruikelijk op tussen de splicedonorplaats in de ingevoegde J-regio en de splice-acceptorplaats voorafgaande aan het humane C-domein, en ook bij de spliceregio's die optreden binnen de humane C_H exonen. Polyadenylatie- en transcriptieterminatie treden op bij natieve chromosomale plaatsen stroomafwaarts van de coderende regio's. De recombinante expressievector kan ook coderen voor een
- 20 signaalpeptide dat secretie van de antilichaamketen uit een gastheer cel faciliteert. Het antilichaamketengen kan ook worden gekloond in een vector zodat het signaalpeptide in frame wordt verbonden aan het amino-einde van de immunoglobulineketen. Het signaalpeptide kan een immunoglobulinesignaalpeptide of een heteroloog signaalpeptide zijn
- 25 (d.w.z. een signaalpeptide uit een niet-immunoglobuline-eiwit).

- [0145]** In aanvulling op de antilichaam keten genen, dragen de recombinante expressievectoren van de uitvinding regulatoire sequenties die de antilichaam keten genen in een gastheer cel controleren. Het zal worden begrepen door deze vaardig in de kunst dat het ontwerp van de
- 30 expressievector, inclusief de selectie van regulatoire sequenties af kan

- hangen van zulke factoren als de keuze van de gastheercel om getransformeerd te worden, het niveau van expressie van gewenst eiwit, etc. Voorkeurs regulatoire sequenties voor zoogdier gastheercel expressie omvatten virale elementen die hoge niveaus van eiwitexpressie in
- 5 zoogdiercellen geven, zoals promotors en/of enhancers verkregen uit retrovirale LTR's, cytomegalovirus (CMV) (zoals de CMV-promotor/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (zoals de SV40-promotor/enhancer), adenovirus (b.v., de adenovirus major late promoter (AdMLP)), polyoma en de sterke zoogdierpromoters zoals natieve
- 10 immunoglobuline en actinepromoters. Voor verdere beschrijving van virale regulatoire elementen, en sequenties daarvan, zie b.v., U.S. Octrooi Nr. 5,168,062, U.S. Octrooi Nr. 4,510,245 en U.S. Octrooi Nr. 4,968,615.
- Werkwijzen voor expressie van antilichamen in planten, omvattende een beschrijving van promotor en vectoren, zowel als transformatie van planten
- 15 is bekend in de kunst. Zie, b.v., Verenigde Staten Octrooi 6,517,529, hierin opgenomen door referentie. Werkwijzen van expressie van polypeptiden in bacteriële cellen of fungale cellen, b.v. gistcellen, zijn ook goed bekend in de kunst.
- [0146]** In aanvulling op de antilichaam keten genen en regulatoire
- 20 sequenties, kunnen de recombinante expressievectoren van de uitvinding additionele sequenties dragen, zoals sequenties die replicatie van de vector in gastheercellen reguleren (b.v., oorsprongen van replicatie) en selecteerbare markergen. Het selecteerbare markergen faciliteert selectie van gastheercellen waarin de vector geïntroduceerd is (zie, b.v. U.S.
- 25 octrooinummers 4,399,216, 4,634,665 en 5,179,017, hierin opgenomen door referentie). Bijvoorbeeld, verschaft het selecteerbare markergen typisch resistentie tegen medicijnen, zoals G418, hygromycine of methotrexaat, aan een gastheercel waarin de vector geïntroduceerd is. Voorkeurs selecteerbare markergen omvatten het dihydrofolaatreductase (DHFR)-gen (voor

toepassing in dhfr-gastheercellen met methotrexaat-selectie/amplificatie), het neogen (voor G418-selectie), en het glutamaatsynthetasegen.

Niet-Hybridomagastheercellen en werkwijzen van Recombinant Eiwit produceren

- 5 [0147] Nucleïnezuurmoleculen coderende voor anti-myostatine antilichamen en vectoren deze nucleïnezuurmoleculen omvattende kunnen worden toegepast voor transfectie van een geschikt zoogdier, plant, bacterie of gist gastheercel. Transformatie kan zijn door een bekende werkwijze voor introductie van polynucleotiden in een gastheercel. Werkwijzen voor
- 10 introductie van heterologe polynucleotiden in zoogdiercellen zijn goed bekend in de kunst en omvatten dextran-gemedieerde transfectie, calciumfosfaatprecipitatie, polybreen-gemedieerde transfectie, protoplasfusie, elektroporatie, inkapseling van de polynucleotide(n) in liposomen, en directe microinjectie van het DNA in nucleï. Daarbij, kunnen
- 15 nucleïnezuurmoleculen worden geïntroduceerd in zoogdiercellen door virale vectoren. Werkwijzen van transformeren van cellen zijn goed bekend in de kunst. Zie, b.v. U.S. Octrooi nrs. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, en 4,959,455, hierin opgenomen door referentie. Werkwijzen van transformeren van plantencellen zijn goed bekend in de kunst, omvattende,
- 20 b.v. agrobacterium-gemedieerde transformatie, biolistische transformatie, directe injectie, elektroporatie en virale transformatie. Werkwijzen van transformeren van bacteriële en gistcellen zijn ook goed bekend in de kunst.

- [0148] Zoogdiercellijnen beschikbaar als gastheren voor expressie zijn goed bekend in de kunst en omvatten vele geïmmortaliseerde cellijnen
- 25 beschikbaar uit de American Type Culture Collection (ATCC). Deze omvatten, onder andere, Chinese hamsterovarium (CHO)-cellen, NS0-cellen, SP2-cellen, HEK-293T-cellen, NIH-3T3-cellen, HeLa-cellen, babyhamsternier (BHK)-cellen, Afrikaanse groene aapnieren (COS), humane hepatocellulaire carcinoomcellen (b.v., Hep G2), A549-cellen, en

een aantal van andere cellijnen. Cellijnen van specifieke voorkeur worden geselecteerd door vast te stellen welke cellijnen hoge expressieniveaus hebben.

Cellijnen anders dan deze van zoogdieroorsprong kunnen ook worden
 5 toegepast. Deze omvatten insectencellijnen (zoals Sf9- of Sf21-cellen), plantencellen (omvattende deze van *Nicotiana*, *Arabidopsis*, eendekroos, maïs, tarwe, aardappel, etc.), bacteriële cellen (omvattende *E. coli* en *Streptomyces*) en gistcellen (omvattende *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia pastoris*).

10 Wanneer recombinante expressie vectoren coderende voor antilichaamgenen worden geïntroduceerd in gastheercellen, wordende antilichamen geproduceerd door het kweken van de gastheercellen gedurende een periode van tijd voldoende om expressie van het antilichaam in de gastheercellen toe te staan of, meer geprefereerd, secretie van het
 15 antilichaam in het kweekmedium waarin de gastheercellen worden gegroeid. Antilichamen kunnen worden teruggewonnen uit het kweekmedium standaard eiwitzuiveringswerkwijzen toepassende.

[0149] Expressie van antilichamen van de uitvinding uit productiecellijnen kan worden versterkt een aantal van bekende technieken
 20 toepassende. Bijvoorbeeld, het glutaminesynthetase genexpressiesysteem (het GS-systeem) is een gebruikelijke benadering voor het versterken van expressie onder bepaalde condities. Het GS-systeem wordt beschreven geheel of gedeeltelijk in samenhang met Europese Octrooi nrs. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 en 0 338 841.

25 [0150] Het is waarschijnlijk dat antilichamen tot uitdrukking gebracht door verschillende cellijnen of in transgene dieren verschillende glycosylatie van elkaar zullen hebben. Echter, alle antilichamen gecodeerd door de nucleïnezuurmoleculen hierin verschaft, of omvattende de aminozuursequenties hierin verschaft zijn deel van de onderhavige
 30 uitvinding, onafhankelijk van de glycosylatie van de antilichamen.

Transgene Dieren en Planten

[0151] Anti-myostatine antilichamen van de uitvinding kunnen ook transgeen worden geproduceerd door de generatie van een dier of plant dat transgeen is voor de immunoglobuline zware en lichte keten sequenties van
 5 interesse en productie van het antilichaam in een terugwinbare vorm daarvan. In samenhang met de transgene productie in dieren, kunnen anti-myostatine antilichamen worden geproduceerd in, en teruggewonnen uit, de melk van geiten, koeien, of andere zoogdieren. Zie, b.v., V.S. Octrooi nrs. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, en 5,741,957, hierin opgenomen door
 10 referentie. In sommige uitvoeringsvormen, worden niet-humane transgene dieren die humane immunoglobulineloci omvatten geïmmuniseerd met myostatine of een immunogeen gedeelte daarvan, zoals boven beschreven. Werkwijzen voor het maken van antilichamen in planten worden beschreven, b.v., in V.S. Octrooien 6,046,037 en 5,959,177, hierin
 15 opgenomen door referentie.

[0152] In sommige uitvoeringsvormen, worden niet-humane transgene dieren of planten geproduceerd door introductie van een of meer nucleïnezuurmoleculen coderende voor een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding in het dier of plant door standaardtransgene technieken.
 20 Zie Hogan en V.S. Octrooi 6,417,429, bovenstaand. De transgene cellen toegepast voor het maken van het transgene dier kunnen embryonale stamcellen of somatische cellen of een bevrucht ei zijn. De transgene niet-humane organismen kunnen chimeer, niet-chimere heterozygoten en niet-chimere homozygoten zijn. Zie, b.v., Hogan et al., Manipulating the Mouse
 25 Embryo: A Laboratory Manual 2^{de} ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics en Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); en Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), alle hierin opgenomen door referentie. In sommige uitvoeringsvormen, hebben de transgene niet-
 30 humane dieren een gerichte disruptie en vervanging door een richtend

construct dat codeert voor een zware keten en/of een lichte keten van
 interesse. In een voorkeursuitvoering, omvatten de transgene dieren en
 brengen tot uitdrukking nucleïnezuurmoleculen coderende voor zware en
 lichte ketens die specifiek binden aan myostatine, bij voorkeur humaan
 5 myostatine. In sommige uitvoeringsvormen, omvatten de transgene dieren
 nucleïnezuurmoleculen coderende voor een gemodificeerd antilichaam zoals
 een enkele keten antilichaam, een chimeer antilichaam of een
 gehumaniseerd antilichaam. De anti-myostatine antilichamen kunnen
 worden gemaakt in een transgeen dier. In een voorkeursuitvoering, zijn de
 10 niet humane dieren muizen, ratten, schapen, varkens, geiten, vee of
 paarden. Het niet-humane transgene dier brengt genoemde gecodeerde
 polypeptiden tot uitdrukking in bloed, melk, urine, speeksel, tranen, mucus
 en ander lichaamsvloeistoffen.

Faag Display -bibliotheek

15 **[0153]** De uitvinding verschaft een werkwijze voor het produceren van
 een anti-myostatine antilichaam of antigeen-bindend gedeelte daarvan
 omvattende de stappen van het synthetiseren van een bibliotheek van
 humane antilichamen op faag, de bibliotheek screenen met myostatine of een
 antilichaam-bindend gedeelte daarvan, de faag die bindt aan myostatine te
 20 isoleren, en het verkrijgen van het antilichaam uit de phage. Als voorbeeld,
 omvat een werkwijze voor het bereiden van de bibliotheek van antilichamen
 voor toepassing in phage display-technieken de stappen van het
 immuniseren van een niet-humaan dier omvattende humane
 immunoglobulineloci met myostatine of een antigeenbindend gedeelte
 25 daarvan om immuunrespons te creëren, antilichaamproducerende cellen
 extraherende uit het geïmmuniseerde dier; het isoleren van RNA coderende
 voor zware en lichte ketens van antilichamen van de uitvinding uit de
 geëxtraheerde cellen, het reverse overschrijven van het RNA om cDNA te
 produceren, het amplifiseren van het cDNA primers toepassende, en het

invoegen van het cDNA in een faag display-vector zodat de antilichamen tot expressie wordt gebracht op de faag. Recombinante anti-myostatine antilichaam van de uitvinding kunnen worden verkregen op deze manier.

- [0154] Recombinante humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding kunnen worden geïsoleerd door het screenen van een recombinante combinatorische antilichaambibliotheek. Bij voorkeur is de bibliotheek een scFv faag display-bibliotheek, gegenereerd toepassende humane V_L en V_H cDNAs bereid uit mRNA geïsoleerd uit B-cellen. Werkwijzen voor bereiding en screening van zulke bibliotheken zijn bekend in de kunst. Kits voor het genereren van faag display-bibliotheken zijn commercieel verkrijgbaar (b.v. het Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; en de Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612). Er zijn ook andere werkwijzen en reagentia die kunnen worden toegepast in het genereren en screenen van antilichaam display-bibliotheken (zie, b.v., U.S. Octrooi Nr. 5,223,409; PCT Publicatie Nrs. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), alle hierin opgenomen door referentie

- [0155] In een uitvoeringsvorm, wordt om humane anti-myostatine antilichamen met de gewenste karakteristieken te isoleren en te produceren, een humaan anti-myostatine antilichaam zoals hierin beschreven eerst toegepast om humane zware en lichte ketensequenties met vergelijkbare bindingsactiviteit voor myostatine te selecteren, de

epitoot inprintingswerkwijzen toepassende beschreven in PCT publicatie no WO 93/06213, hierin opgenomen door referentie. De antilichaam – bibliotheken toegepast in deze werkwijze zijn bij voorkeur scFv bibliotheken bereid en gescreend als beschreven in PCT publicatie No. WO 92/01047, 5 McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); en Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), alle hierin opgenomen door referentie. De scFv antilichaam bibliotheken worden bij voorkeur gescreend humane myostatine toepassende als het antigeen.

- [0156] Wanneer initiële V_L en V_H domeinen geselecteerd zijn worden, 10 “mix en match” experimenten uitgevoerd, waarin verschillende paren van de initieel geselecteerde V_L en V_H segmenten worden gescreend voor myostatinebinding om geprefereerde V_L/V_H pair combinaties te selecteren. Daarbij, om de kwaliteit van het antilichaam verder te verbeteren, kunnen de V_L en V_H segmenten van de geprefereerde V_L/V_H paar (paren) 15 willekeurig gemuteerd worden, bij voorkeur binnen de CDR3-regio van V_H en/of V_L , in een proces analoog aan het in vivo somatische mutatieproces verantwoordelijk voor affiniteitsmaturing van antilichamen gedurende een natuurlijke immuunrespons. Deze in vitro affiniteitsmaturing kan worden bereikt door amplificering van V_H en V_L domeinen PCR-primers 20 complimentair aan de V_H CDR3 of V_L CDR3 toepassende, respectievelijk, welke primers zijn “gespiked” met een willekeurig mengsel van de vier nucleotidebasen op bepaalde posities zodat de resulterende PCR-producten voor V_H en V_L segmenten coderen waarin willekeurige mutaties zijn geïntroduceerd in de V_H en/of V_L CDR3-regio's. Deze willekeurig 25 gemuteerde V_H en V_L segmenten kunnen worden gere-screend voor binding aan myostatine.

- [0157] Volgend op screening en isolatie van een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding uit een recombinante immunoglobulinedisplay-bibliotheek, kunnen nucleïnezuren coderende voor 30 het geselecteerde antilichaam worden teruggewonnen uit het display-

pakket (b.v., uit het faaggenoom) en gesubkloond in andere expressievectoren door standaardrecombinante DNA-technieken. Indien gewenst, kan het nucleïnezuur verder worden gemanipuleerd om andere antilichaamvormen van de uitvinding te creëren, zoals beneden beschreven.

- 5 Om een recombinant humaan antilichaam geïsoleerd door screening van een combinatorische bibliotheek tot uitdrukking te brengen, wordt het DNA coderende voor het antilichaam gekloond in een recombinante expressievector en geïntroduceerd in een zoogdiergastheercellen, zoals boven beschreven.

10 *Klassewisseling*

- [0159] Een ander aspect van de uitvinding verschaft een werkwijze voor het veranderen van de klasse of subklasse van een anti-myostatine antilichaam naar een andere klasse of subklasse. In sommige uitvoeringsvormen, wordt een nucleïnezuur coderende voor een V_L of V_H dat
- 15 niet omvat sequenties coderende voor C_L of C_H geïsoleerd werkwijzen goed bekend in de kunst toepassende. Het nucleïnezuurmolecuul wordt dan operatief verbonden aan een nucleïnezuursequentie coderende voor een C_L of C_H van een gewenste immunoglobulineklasse of -subklasse. Dit kan worden bereikt toepassende een vector of nucleïnezuurmolecuul dat omvat
 - 20 een C_L of C_H keten, zoals boven beschreven. Bijvoorbeeld, een anti-myostatine antilichaam dat oorspronkelijk IgM was kan worden gewisseld van klasse naar een IgG. Verder, kan de klassewisseling worden toegepast om een IgG-subklasse naar een andere te converteren, bijvoorbeeld, van IgG1 naar IgG2. Een andere werkwijze voor het produceren van een
 - 25 antilichaam van de uitvinding omvattende een gewenst isotype omvat de stappen van het isoleren van een nucleïnezuur coderende voor een zware keten van een anti-myostatine antilichaam en een nucleïnezuur coderende voor een lichte keten van een anti-myostatine antilichaam, het isoleren van de sequentie coderende voor de V_H regio, het ligeren van de V_H sequentie

aan een sequentie coderende voor een zware keten constant domein van het gewenste isotype, het tot expressie brengen van het lichte keten gen en het zware keten construkt in een cel, en het verzamelen van het anti-myostatine antilichaam met het gewenste isotype.

5 *Gedeïmmuniseerde Antilichamen*

[0159] In een ander aspect van de uitvinding, kan een antilichaam worden gedeïmmuniseerd om zijn immunogeniciteit te verminderen technieken toepassende beschreven in, b.v., PCT Publicatie Nrs. WO98/52976 en WO00/34317 (hierin opgenomen door referentie).

10 *Gemuteerde Antilichamen*

[0160] In een andere uitvoeringsvorm, kunnen de nucleïnezuurmoleculen, vectoren en gastheercellen worden toegepast om gemuteerde anti-myostatine antilichamen te maken. De antilichamen kunnen worden gemuteerd in de variabele domeinen van de zware en/of lichte ketens, bijvoorbeeld, om een bindingseigenschap van het antilichaam te veranderen. Bijvoorbeeld kan een mutatie worden gemaakt in een of meer van de CDR regio's om de K_D van het antilichaam voor myostatine te verhogen of te verminderen, om k_{off} te verhogen of verminderen, of om de bindingsspecificiteit van het antilichaam te veranderen. Technieken in plaatsgerichte mutagenese zijn goed bekend in de kunst. Zie, b.v. Sambrook et al. en Ausubel et al., hierboven.. In een andere uitvoeringsvorm, worden een of meer mutaties gemaakt in een aminozuur residu dat bekend is veranderd te zijn vergeleken met de stamlijn in monoklonaal antilichaam 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. De mutaties kunnen worden gemaakt in een CDR regio of

framework regio van een variabel domein, of in een constant domein. In een voorkeursuitvoering, worden de mutaties gemaakt in een variabel domein. In sommige uitvoeringsvormen, worden een of meer mutaties gemaakt in een aminozuuresidu dat bekend is veranderd te zijn vergeleken met de

5 stamlijn in een CDR regio of framework regio van een variabel domein van een aminozuursequentie geselecteerd uit SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85 of 87 of waarvan de nucleïnezuursequentie wordt gepresenteerd in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,

10 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86 of 88.

[0161] In een andere uitvoeringsvorm, wordt de frameworkregio gemuteerd zo dat resulterende frameworkregio(s) de aminozuursequentie hebben van het corresponderende stamlijngen. Een mutatie kan worden

15 gemaakt in een frameworkregio of constant domein om de halfwaardetijd van het anti-myostatine antilichaam te verhogen. Zie, b.v. PCT Publicatie Nr. WO 00/09560, hierin opgenomen door referentie. Een mutatie in een frameworkregio of constant domein kan ook worden gemaakt om de immunogeniciteit van het antilichaam te veranderen, een plaats voor

20 covalente of niet-covalente binding aan een ander molecuul te verschaffen, of om zulke eigenschappen te veranderen als complementfixatie, FcR-binding en antilichaamafhankelijke cel-gemedieerde cytotoxiciteit (ADCC). Volgens de uitvinding, kan een enkel antilichaam mutaties hebben in een of meer van de CDR's of frameworkregio's van het variabele domein of in het

25 constante domein.

[0162] In sommige uitvoeringsvormen, zijn er van 1 tot 8, omvattende elk nummer er tussen in, aminozuurmutaties in ofwel de V_H ofwel de V_L domeinen van het gemuteerde anti-myostatine antilichaam vergeleken met het anti-myostatine antilichaam voorafgaand aan mutatie. In een van de

30 bovenstaande, kunnen de mutaties optreden in een of meer CDR-regio's.

Verder, kunnen elk van de mutaties conservatieve aminozuursubstituties zijn. In sommige uitvoeringsvormen, zijn er niet meer 5, 4, 3, 2, of 1 aminozuurveranderingen in de constant domeinen.

Gemodificeerde Antilichamen

- 5 **[0163]** In een andere uitvoeringsvorm, kan een fusieantilichaam of immuno adhesine worden gemaakt dat omvat geheel of een gedeelte van een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding verbonden aan een ander polypeptide. In een voorkeursuitvoering, zijn alleen de variabele domeinen van het anti-myostatine antilichaam verbonden aan het polypeptide. In een
- 10 andere voorkeursuitvoering, is het V_H domein van een anti-myostatine antilichaam verbonden aan een eerste polypeptide, terwijl het V_L domein van een anti-myostatine antilichaam is verbonden aan een tweede polypeptide dat associeert met het eerste polypeptide op een wijze zodat de V_H en V_L domeinen interactie kunnen vertonen met elkaar om een antigeen
- 15 bindingsplaats te vormen. In een andere voorkeursuitvoering, is het V_H domein gescheiden van het V_L domein door een linker zodat de V_H en V_L domeinen interactie kunnen vertonen met elkaar (zie beneden onder enkele ketenantilichamen). Het V_H -linker- V_L antilichaam is dan verbonden aan het polypeptide van interesse. Daarbij, kunnen fusieantilichamen worden
- 20 gecreëerd waarin twee (of meer) enkele ketenantilichamen zijn verbonden aan elkaar. Dit is bruikbaar als iemand een divalent of polyvalent antilichaam op een enkele polypeptideketen wil creëren, of als iemand een bispecifiek antilichaam wil creëren.

- [0164]** Om een enkele keten antilichaam te creëren, (scFv) worden de V_H -
- 25 en V_L -coderende DNA fragmenten operatief verbonden aan een ander fragment coderende voor een flexibele linker, bijvoorbeeld, coderende voor de aminozuursequentie $(Gly_4-Ser)_3$, (SEQ ID NO:122) zodat de V_H en V_L sequenties tot uitdrukking kunnen worden gebracht als een aaneengesloten enkel keteneiwit, met de V_L en V_H domeinen verbonden door de flexibele

linker. Zie, b.v., Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). Het enkele keten antilichaam kan monovalent zijn, als alleen een enkele V_H en V_L worden toegepast, bivalent, als twee V_H en V_L worden toegepast, of polyvalent, als meer dan twee V_H en V_L worden toegepast. Bispecifieke of polyvalente antilichamen kunnen worden gegenereerd die specifiek binden aan myostatine en aan een ander molecuul.

[0165] In andere uitvoeringsvormen, kunnen andere gemodificeerde antilichamen worden bereid, anti-myostatine antilichaam coderende voor nucleïnezuurmoleculen toepassende. Bijvoorbeeld, "kappa-bodies" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diabodies" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), of "Janusins" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) en Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992)) kunnen worden bereid standaard moleculaire biologische technieken toepassende volgende de lessen van de beschrijving.

[0166] Bispecifieke antilichamen of antigeen-bindende fragmenten kunnen worden geproduceerd door een verscheidenheid van werkwijzen omvattende fusie van hybridoma's of verbinding van Fab-fragmenten. Zie, b.v., Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Daarbij, kunnen bispecifieke antilichamen worden gevormd als "diabodies" of "Janusins." In sommige uitvoeringsvormen, bindt het bispecifieke antilichaam aan twee verschillende epitopen van myostatine. In sommige uitvoeringsvormen, heeft het bispecifieke antilichaam een eerste zware keten en een eerste lichte keten van monoklonaal antilichaam 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I;

2_112_1H-L81M, L-I85V; of 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V en een
 additioneel antilichaam zware keten en lichte keten. In sommige
 uitvoeringsvormen, zijn de additionele lichte keten en zware keten ook van
 een van de boven geïdentificeerde monoklonale antilichamen, maar zijn
 5 verschillend van de eerste zware en lichte ketens.

[0167] In sommige uitvoeringsvormen, worden de gemodificeerde
 antilichamen boven beschreven bereid toepassende een of meer van de
 variabele domeinen of CDR regio's van een humaan anti-myostatine
 monoklonaal antilichaam hierin verschaft.

10 *Gederivatiseerde en gelabelde Antilichamen*

[0168] Een anti-myostatine antilichaam of antigeenbindend gedeelte van
 de uitvinding kan worden gederivatiseerd of verbonden aan een ander
 molecuul (b.v., een ander peptide of eiwit). In het algemeen, zijn de
 antilichamen of gedeelten daarvan gederivatiseerd zodat de
 15 myostatinebinding niet negatief is aangetast door de derivatisering of
 labelling. Overeenkomstig, zijn de antilichamen en antilichaamgedeelten
 van de uitvinding bedoeld te omvatten zowel intacte als gemodificeerde
 vormen van de humane anti-myostatine antilichamen hierin beschreven.
 Bijvoorbeeld, een antilichaam of een antilichaamgedeelte van de uitvinding
 20 kan functioneel worden verbonden (door chemische koppeling, genetische
 fusie, non-covalente associatie of anderszins) aan een of meer andere
 moleculaire eenheden, zoals een ander antilichaam (b.v., een bispecifiek
 antilichaam of diabody), een detectieagens, een farmaceutisch agens en/of
 een eiwit of peptide dat associatie van het antilichaam of
 25 antilichaamgedeelte met een ander molecuul kan mediëren (zoals een
 streptavidine kernregio of een polyhistidine label).

[0169] Een type van gederivatiseerd antilichaam wordt geproduceerd
 door het kruisverbinden van twee of meer antilichamen (van hetzelfde type
 of van verschillende types, b.v. om bispecifieke antilichamen te creëren).

Geschikte kruislinkers omvatten deze die heterobifunctioneel zijn, hebbende twee afzonderlijke reactieve groepen gescheiden door een geschikte spacer (b.v., m-maleïmidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide-ester) of homobifunctioneel (b.v., disuccinimidylsuberaat). Zulke linkers zijn
 5 verkrijgbaar van Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0170] Een ander type van gederivatiseerd antilichamen is een gelabeld antilichaam. Bruikbare detectieagentia waarmee een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte van de uitvinding kan worden gederivatiseerd omvat fluorescente verbindingen, omvattende fluoresceïne, fluoresceïne-
 10 isothiocyanaat, rhodamine, 5-dimethylamine-1-naftaleensulfonylchloride, fyco-erythrine, lanthanidefosfaten en dergelijke. Een antilichaam kan ook worden gelabeld met enzymen die bruikbaar zijn voor detectie, zoals horseradishperoxidase, β -galactosidase, luciferase, alkalinefosfatase, glucoseoxidase en dergelijke. Wanneer een antilichaam wordt gelabeld met
 15 een detecteerbaar enzym, wordt het gedetecteerd door toevoeging van additionele reagentia die het enzym toepast om een reactieproduct te produceren dat kan worden onderscheiden. Bijvoorbeeld, wanneer het agens horseradishperoxidase aanwezig is, leidt de toevoeging van waterstofperoxide en diaminobenzidine tot een gekleurd reactieproduct,
 20 welke detecteerbaar is. Een antilichaam kan ook worden gelabeld met biotine, en gedetecteerd door indirecte meting van avidine- of streptavidinebinding. Een antilichaam kan ook worden gelabeld met een vooraf vastgesteld polypeptide-epitoom herkend door een secundaire reporter (b.v., leucine zipper paarsequenties, bindingsplaatsen voor
 25 secundaire antilichamen, metaalbindingsdomeinen, epitooptags). In sommige uitvoeringsvormen, zijn labels verbonden door spacer-armen van verschillende lengten om potentiële sterische hindering te verminderen.

[0171] Een anti-myostatine antilichaam kan ook worden gederivatiseerd met een chemische groep zoals polyethyleenglycol (PEG), een methyl- of
 30 ethylgroep, of koolhydraatgroep. Deze groepen zijn bruikbaar om de

biologische eigenschappen van het antilichaam te verbeteren, bijvoorbeeld, om de serumhalfwaardetijd te verhogen.

Farmaceutische samenstellingen en kits

[0172] De uitvinding heeft ook betrekking op samenstellingen
5 omvattende een humaan anti-myostatine antilichaam met inhibitoire eigenschappen.

[0173] De antagonist-anti-myostatine antilichamen van de uitvinding zijn bruikbaar om te voorkomen of te behandelen een breed bereik van condities en aandoeningen waarin het gewenst is skeletspiermassa en/of bot toe te
10 laten nemen. In sommige gevallen, kunnen zulke condities en aandoeningen leeftijdsgerelateerd of ziektegerelateerd zijn. Een antagonist-anti-myostatine antilichaam van de uitvinding kan worden toegepast om te behandelen, te voorkomen of te inhiberen leeftijdsgerelateerd verlies van spiermassa en -sterkte omvattende spieratrofie die resulteert van,
15 bijvoorbeeld, immobilisatie.

[0174] Daarbij, is een antagonist-anti-myostatine antilichaam van de uitvinding bruikbaar om te behandelen of te voorkomen spierverlies in wasting-ziekten of andere ziekten of condities, geassocieerd met verlies van spiermassa, omvattende, maar niet beperkt tot, trauma (omvattende spier-,
20 zenuw- en bottrauma), verbranding, AIDS, kanker, heupfracturen (specifiek in de ouderen), gewrichtsvervanging, acute knieverwondingen, artritis, chronisch nierfalen (CRF), congestief hartfalen (CHF), chronische obstructieve pulmonaire ziekte (COPD), multipale sclerose (MS), de ziekte van Parkinson, chronische kritische ziekte, centraal zenuwstelsel (CNS)-
25 verwonding, beroerte, cachexie, spierdystrofiesyndroom, operatie- en gewrichtsverwonding.

[0175] Antagonist-anti-myostatine antilichamen van de uitvinding zijn ook bruikbaar om metabole condities te behandelen. Zulke condities

omvatten type 2 diabetes mellitus, metabole syndromen zoals syndroom X, insulineresistentie, verminderde glucosetolerantie en obesitas.

[0176] Verder, is een antagonist-anti-myostatine antilichaam van de uitvinding bruikbaar om te behandelen of te voorkomen ziekten
 5 geassocieerd met botverlies, omvattende maar niet beperkt tot leeftijds- of hormoongerelateerde osteoporoseosteopenia, osteoartritis, en osteoporosegerelateerde fractures.

[0177] Behandeling kan omvatten toediening van een of meer inhibitoire anti-myostatine-monoklonale antilichamen van de uitvinding, of
 10 antigeenbindende fragmenten daarvan, alleen of met een farmaceutisch acceptabele drager. Inhibitoire anti-myostatine antilichamen van de uitvinding en samenstellingen ze omvattende, kunnen worden toegediend in combinatie met een of meer andere therapeutische, diagnostische of profylactische agentia. Additionele therapeutische agentia omvatten anti-
 15 spierdystrofie agentia (inclusief steroiden zoals prednison, deflazacort), en anabole steroiden, albuterol, voedingssupplementen zoals creatine, en antibiotica zoals gentamycine. Additionele therapeutische agentia omvatten ook anti-diabetes agentia omvattende, maar niet beperkt tot, metformine, sulfonyleureas, insuline, pramlintide (SYMLIN®), TZD's zoals rosiglitazon
 20 (Avandia®) en pioglitazon (Actos®), GLP-1-analogen, zoals exenitide, en DPP-IV-inhibitoren, zoals LAF237. Verder, omvatten aanvullende therapeutische agentia anti-osteoporoseagentia omvattende, maar niet beperkt tot, bifosfonaten zoals alendronaat (Fosamax®) en risedronaat (Actonel®), cacitonine (Miacalci®), Raloxifen (Evista®), hormonale agentia
 25 zoals oestrogeen en parathyroïet. Zulke aanvullende agentia kunnen worden omvat in dezelfde samenstelling of afzonderlijk toegediend. Zoals hierin toegepast, betekent "farmaceutisch acceptabele drager" ieder en alle oplosmiddelen, dispersiemedia, bekledingsmiddelen, antibacteriële en antifungale agentia, isotone en absorptievertragende agentia, en dergelijke
 30 die fysiologisch compatibel zijn. Sommige voorbeelden van farmaceutisch

acceptabele dragers zijn water, zoutoplossing, fosfaatgebufferde zoutoplossing, dextrose, glycerol, ethanol en dergelijke, zowel als combinaties daarvan. In vele gevallen, zal het geprefereerd zijn isotone agentia te omvatten, bijvoorbeeld, suikers, polyalcoholen zoals mannitol, sorbitol of natriumchloride in de samenstelling. Aanvullende voorbeelden van farmaceutisch acceptabele substanties zijn bevochtigingsagentia of kleine hoeveelheden van hulpstoffen zoals bevochtigings- of emulgerende agentia, conserveringsmiddelen of buffers, welke de plankleeftijd of effectiviteit van het antilichaam verhogen.

- 10 **[0178]** De samenstellingen van deze uitvinding kunnen in een variëteit van vormen zijn, bijvoorbeeld, vloeistof, halfvast en vaste doseringsvormen, zoals vloeibaar oplossingen (b.v., injecteerbare en infuseerbare oplossingen), dispersies of suspensies, tabletten, pillen, poeders, liposomen en zetpillen. De voorkeursvorm hangt af van de bedoelde wijze van toediening en
- 15 therapeutische applicatie. Typisch geprefereerde samenstellingen zijn in de vorm van injecteerbare of infuseerbare oplossingen, zoals samenstellingen vergelijkbaar aan deze toegepast voor passieve immunisatie van mensen. De voorkeurswijze van toediening is parenteraal (b.v., intraveneus, subcutaan, intraperitoniaal, intramusculair). In een voorkeursuitvoering,
- 20 wordt het antilichaam toegediend door intraveneuze infusie of injectie. In een andere voorkeursuitvoering, wordt het antilichaam toegediend door intramusculaire of subcutane injectie.

- [0179]** Therapeutische samenstellingen moeten typisch steriel en stabiel zijn onder de condities van vervaardiging en opslag. De samenstelling kan
- 25 worden geformuleerd als een oplossing, micro-emulsie, dispersie, liposoom, of andere geordende structuur geschikt voor hoge medicijnconcentratie. Steriele en injecteerbare oplossingen kunnen worden bereid door het antimyostatine antilichaam in te bouwen in de benodigde hoeveelheid in een geschikt oplosmiddel met een of een combinatie van ingrediënten opgesomd
- 30 hierboven, zoals benodigd, gevolgd door gefilterde sterilisatie. In het

- algemeen, worden dispersies bereid door de actieve verbinding in te bouwen in een steriel vehikel dat een basisch dispersiemedium bevat en de benodigde andere ingrediënten van deze hierboven opgesomd. In het geval van steriele poeders voor de bereiding van steriele injecteerbare
- 5 oplossingen, zijn de voorkeurswerkwijzen van bereiding vacuümdroging en vriesdroging die een poeder van het actieve ingrediënt opbrengt plus een additioneel gewenst ingrediënt van een voorafgaand steriel gefilterde oplossing daarvan. De juiste vloeibaarheid van een oplossing kan worden
- 10 behouden, bijvoorbeeld, door de toepassing van een coating zoals lecithine, door het behoud van de benodigde partikelgrootte in het geval van dispersie en door de toepassing van surfactanten. Verlengde absorptie van injecteerbare samenstellingen kan worden bewerkstelligd door in de samenstelling een agens op te nemen dat absorptie vertraagt, bijvoorbeeld, monostearaatzouten en gelatine.
- 15 **[0180]** In een uitvoeringsvormen, wordt het antilichaam toegediend in een formulering als een steriele waterige oplossing hebbende een pH die varieert van ongeveer 5,0 tot ongeveer 6,5 en omvattende van ongeveer 1 mg/ml tot ongeveer 200 mg/ml antilichaam, van ongeveer 1 millimolair tot ongeveer 100 millimolair histidinebuffer, van ongeveer 0,01 mg/ml tot 10
- 20 mg/ml polysorbaat 80, van ongeveer 100 millimolair tot ongeveer 400 millimolair trehalose, en van ongeveer 0,01 millimolair tot ongeveer 1,0 millimolair dinatrium-EDTA-dihydraat.
- [0181]** De antilichamen van de onderhavige uitvinding kunnen worden toegediend door een verscheidenheid van werkwijzen bekend in de kunst,
- 25 alhoewel voor veel therapeutische applicaties, de voorkeursroute/wijze van toediening subcutaan, intramusculair of intraveneuze infusie is. Zoals zal worden begrepen door de vakman, zal de route en/of wijze van toediening variëren afhankelijk van de gewenste resultaten.
- [0182]** In bepaalde uitvoeringsvormen, kan de actieve verbinding van de
- 30 antilichaamsamenstellingen verbinding worden bereid met een drager die

het antilichaam zal beschermen tegen snelle vrijgave, zoals een gecontroleerde vrijgaveformulering, omvattende implantaten, transdermale patches, en micro-ingekapselde afleveringssystemen. Biodegradeerbare, biocompatibele polymeren kunnen worden toegepast, zoals

- 5 ethyleenvinylacetaat, polyanhydriden, polyglycolzuur, collageen, polyorthoesters en meervoudig melkzuur. Vele werkwijzen voor de bereiding van zulke formuleringen zijn geïmplementeerd of algemeen bekend aan de vakmensen. Zie, b.v., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).
- 10 [0183] In bepaalde uitvoeringsvormen, kan een anti-myostatine antilichaam van de uitvinding oraal worden toegediend, bijvoorbeeld, met een inert oplosmiddel of een assimileerbare eetbare drager. De verbinding (en andere ingrediënten, indien gewenst) kunnen ook worden ingesloten in een harde of zachte schil gelatinecapsule, samengeperst in tabletten, of
- 15 ingebouwd direct in het dieet van de patiënt. Voor orale therapeutische toediening, kunnen de anti-myostatine antilichamen worden ingebouwd met excipiënten en toegepast in de vorm van opneembare tabletten, buccale tabletten, dragees, capsules, elixers, suspensies, siropen, wafels en dergelijke. Om een verbinding van de uitvinding toe te dienen door middel
- 20 van andere dan parenterale toediening, kan het nodig zijn de verbinding te coaten met, of de verbinding samen toe te dienen met, een materiaal om zijn inactivatie te voorkomen.

- [0184] Additionele actieve verbindingen kunnen ook worden ingebouwd in de samenstellingen. In bepaalde uitvoeringsvormen, wordt een inhibitor
- 25 anti-myostatine antilichaam van de uitvinding samen geformuleerd met en/of samen toegediend met een of meer additionele therapeutische agentia. Deze agentia omvatten, zonder beperking, antilichamen die binden andere doelen, antineoplastische agentia, antitumoragentia, chemotherapeutische agentia, peptideanalogen die myostatine inhiberen, of antilichamen of
- 30 andere moleculen die binden aan type II membraanreceptoren en hun

binding aan of activatie door myostatine voorkomen. Zulke combinatietherapieën kunnen lagere doses van het inhibitoire anti-myostatine antilichaam zowel als van de tegelijk toegediende agentia vereisen, zodoende mogelijke toxiciteiten of complicaties geassocieerd met
 5 de verschillende monotherapieën vermijdende.

[0185] Inhibitoire anti-myostatine antilichamen van de uitvinding en samenstellingen ze omvattende kunnen ook worden toegediend in combinatie met andere therapeutische regimes, in het bijzonder in combinatie met oefening en/of dieet (inclusief nutritionele) supplementen.

10 **[0186]** In bepaalde uitvoeringsvormen, wordt een inhiberend anti-myostatine antilichaam van de uitvinding tezamen geformuleerd met en/of tezamen toegediend met een of meer additionele therapeutische agentia beschreven, bovenstaand. Deze agentia omvatten deze die myostatine inhiberen. Verder, kunnen zulke combinatietherapieën ook worden
 15 toegepast om te behandelen, te voorkomen of te inhiberen een van de voornoemde ziekten en condities. Zulke combinatietherapieën kunnen lagere doses van het inhibitoire anti-myostatine antilichaam vereisen zowel als van de tezamen toegediende agentia, zo mogelijke toxiciteiten of complicaties geassocieerd met de verschillende monotherapieën
 20 vermijdende.

[0187] De samenstellingen van de uitvinding kunnen omvatten een "therapeutisch effectieve hoeveelheid" of een "profylactische effectieve hoeveelheid" van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte van de uitvinding. Een "therapeutisch effectieve hoeveelheid" refereert aan een
 25 hoeveelheid effectief, in doses en gedurende perioden van tijd noodzakelijk, om het gewenste therapeutische resultaat te bereiken. Een therapeutisch effectieve hoeveelheid van het antilichaam of antilichaamgedeelte kan variëren volgens factoren zoals de ziektestatus, leeftijd, sexe, en gewicht van het individu, en de mogelijkheid van het antilichaam of
 30 antilichaamgedeelte om een gewenste respons in het individu op te wekken.

Een therapeutisch effectieve hoeveelheid is ook een waarin toxische of schadelijke effecten van het antilichaam of antilichaamgedeelte worden gecompenseerd door de therapeutisch gunstige effecten. Een "profylactisch effectieve hoeveelheid" refereert aan een hoeveelheid effectief, in doses en
 5 voor perioden van tijd noodzakelijk, om het gewenste profylactische resultaat te bereiken. Typisch, omdat een profylactische dosis wordt toegepast in patiënten voorafgaand aan of in een eerder stadium van ziekte, kan de profylactisch effectieve hoeveelheid minder zijn dan de therapeutisch effectieve hoeveelheid.

- 10 **[0188]** Dosisregimes kunnen worden aangepast om de optimaal gewenste respons te verschaffen (b.v., een therapeutische of profylactische respons). Bijvoorbeeld, een enkele bolus kan worden toegediend, verschillende verdeelde doses kunnen worden toegediend over tijd of de dosis kan proportioneel worden verminderd of vermeerderd zoals aangegeven door de
 15 behoeften van de therapeutische situatie. Het is specifiek voordelig om parenterale samenstellingen te formuleren in dosesseenheidsvorm voor gemak van toediening en uniformiteit van dosering. Doseringseenheidvorm zoals hierin toegepast refereert aan fysieke discrete eenheden geschikt als eenheidsdoseringen voor de zoogdierpatiënten om behandeld te worden;
 20 elke eenheid omvattende een vooraf vastgestelde hoeveelheid van actieve verbinding berekend om het gewenste therapeutische effect in samenhang met de vereiste farmaceutische drager te produceren. De specificatie voor de doseringseenheidvormen van de uitvinding worden gedicteerd door en zijn direct afhankelijk van (a) de unieke eigenschappen van het anti-
 25 myostatine antilichaam of gedeelte daarvan en de specifieke therapeutische of profylactische effecten om bereikt te worden, en (b) de beperkingen inherent in de kunst van samenstelling van zo'n antilichaam voor de behandeling van gevoeligheid in individuen.

- 30 **[0189]** Een voorbeeld, niet-limiterend bereik voor een therapeutisch of profylactisch effectieve hoeveelheid van een antilichaam of

- antilichaamgedeelte van de uitvinding is 0,025 tot 50 mg/kg, meer bij voorkeur 0,1 tot 50 mg/kg, meer bij voorkeur 0,1-25, 0,1 tot 10 of 0,1 tot 3 mg/kg. In sommige uitvoeringsvormen, omvat een formulering 5 mg/ml antilichaam in een buffer van 20 mM natriumcitraat, pH 5,5, 140 mM NaCl en 0,2 mg/ml polysorbaat 80. Het moet opgemerkt worden dat doseringswaarden kunnen variëren met het type en ernst van de conditie om te verbeteren. Het moet verder worden begrepen dat voor elke specifieke patiënt, specifieke doseringsregimes moeten worden aangepast over tijd volgens de individuele behoefte en de professionele inschatting van de
- 10 persoon toedienende of superviserende de toediening van de samenstellingen, en dat doseringsbereiken hierin uiteengezet alleen als voorbeeld zijn en niet zijn bedoeld de omvang of praktijk van de geclaimde samenstelling te beperken.
- [0190] Een ander aspect volgens de onderhavige uitvinding verschaft kits
- 15 omvattende een antio-myostatoire antilichaam of antigeenbindend gedeelte van de uitvinding of een samenstelling omvattende zo'n antilichaam of gedeelte. Een kit kan omvatten, in toevoeging op het antilichaam of samenstelling, diagnostische of therapeutische agentia. Een kit kan ook omvatten instructies voor toepassing in een diagnostische of therapeutische
- 20 werkwijze. In een voorkeursuitvoering, omvat de kit het antilichaam of een samenstelling het omvattende en een diagnostisch agens dat kan worden toegepast in een werkwijze beneden beschreven. In een andere voorkeursuitvoering, omvat de kit het antilichaam of een samenstelling het omvattende en een of meer therapeutische agentia die kunnen worden
- 25 toegepast in een werkwijze beneden beschreven.

Diagnostische werkwijzen van toepassing

[0191] In een ander aspect, verschaft de uitvinding diagnostische werkwijzen. De anti-myostatine antilichamen kunnen worden toegepast om myostatine te detecteren in een biologisch monster in vitro of in vivo.

[0192] De anti-myostatine antilichamen kunnen worden toegepast in een
5 conventionele immunoassay, omvattende, zonder beperking, een ELISA, een RIA, flowcytometrie, weefsel immunohistochemie, Western Blot of immunoprecipitatie. De anti-myostatine antilichamen van de uitvinding kunnen worden toegepast om myostatine van mensen te detecteren. In een andere uitvoeringsvorm, kunnen de anti-myostatine antilichamen worden
10 toegepast om myostatine te detecteren van, bijvoorbeeld, muizen, cynomolgus apen, rat, hond, kwartel, kip, kalkoen, varken en paard.

[0193] De uitvinding verschaft een werkwijze voor het detecteren van myostatine in een biologisch monster omvattende het in contact brengen van het biologisch monster met anti-myostatine antilichaam van de
15 uitvinding en het detecteren van het gebonden antilichaam. In een uitvoeringsvorm, is het anti-myostatine antilichaam direct gelabeld met een detecteerbaar label. In een andere uitvoeringsvorm, is het anti-myostatine antilichaam (het eerste antilichaam) ongelabeld en is het tweede antilichaam of andere molecuul dat het anti-myostatine antilichaam kan
20 binden gelabeld. Zoals goed bekend is aan een vakman, wordt een tweede antilichaam gekozen dat in staat is specifiek te binden het specifieke soort en klasse van het eerste antilichaam. Bijvoorbeeld, als het anti-myostatine antilichaam een humaan IgG is, dan kan het tweede antilichaam een antihumaan IgG zijn. Andere moleculen die aan antilichamen binden
25 kunnen omvatten, zonder beperking, eiwit A en eiwit G, welke beide commercieel verkrijgbaar zijn, b.v., van Pierce Chemical Co.

[0194] Geschikte labels voor het antilichaam of secundaire antilichaam zijn boven beschreven, en omvatten verschillende enzymen, prosthetische groepen, fluorescente materialen, luminiscente materialen en radioactieve
30 materialen. Voorbeelden van geschikte enzymen omvatten

horseradishperoxidase, alkalinefosfatase, β -galactosidase, of acetylcholinesterase; voorbeelden van geschikte prosthetische groepencomplexen omvatten streptavidine/biotine en avidine/biotine; voorbeelden van geschikte fluorescente materialen omvatten umbelliferoon,
 5 fluoresceine, fluoresceine-isothiocyanaat, rhodamine, dichlorotriazinylaminefluoresceine, dansylchloride of fcyco-erythrine; een voorbeeld van een luminescent materiaal omvat luminol; en voorbeelden van geschikte radiactieve materialen omvatten ^{123}I , ^{131}I , ^{35}S of ^3H .

[0195] In andere uitvoeringsvormen, kan myostatine worden getoetst in
 10 een biologisch monster door een competitie-immunoassay myostatinestandaarden toepassende gelabeld met een detecteerbare substantie en een ongelabeld anti-myostatine antilichaam. In dit assay worden het biologisch monster, de gelabelde myostatinestandaarden en het anti-myostatine antilichaam gecombineerd en de hoeveelheid gelabeld
 15 myostatinestandaard gebonden aan het ongelabelde antilichaam wordt vastgesteld. De hoeveelheid myostatine in het biologische monster is omgekeerd evenredig aan de hoeveelheid gelabeld myostatinestandaard gebonden aan het anti-myostatine antilichaam.

[0196] Iemand kan de immunoassays boven beschreven toepassen voor
 20 een aantal doeleinden. Bijvoorbeeld, kunnen de anti-myostatine antilichamen worden toegepast om myostatine in gekweekte cellen te detecteren. In een voorkeursuitvoering, worden de anti-myostatine antilichamen toegepast om de hoeveelheid myostatine geproduceerd door cellen die zijn behandeld met verschillende verbindingen vast te stellen.
 25 Deze werkwijze kan worden toegepast om verbindingen die myostatine-eiwitniveaus moduleren te identificeren. Volgens deze werkwijze, wordt één monster van cellen behandeld met een testverbinding gedurende een periode van tijd terwijl een ander monster onbehandeld wordt gelaten. Als het totale niveau van myostatine gemeten moet worden, worden de cellen
 30 gelyseerd en wordt het totale myostatineniveau gemeten één van de

immunoassays boven beschreven toepassende. Het totale niveau van myostatine in de behandelde versus de onbehandelde cellen wordt vergeleken om het effect van de testverbinding vast te stellen.

- [0197] Een voorkeursimmunoassay voor het meten van totale
 5 myostatineniveaus is flowcytometrie of immunohistochemie. Werkwijzen zoals ELISA, RIA, flowcytometrie, Western blot, immunohistochemie, celoppervlaktelabelling van integrale membraaneiwitten en immunoprecipitatie zijn goed bekend in de kunst. Zie, b.v., Harlow en Lane, bovenstaand. Daarbij, kunnen de immunoassays worden opgeschaald voor
 10 high throughput screening om een groot aantal van verbindingen te testen ofwel voor activatie of voor inhibitie van myostatine-expressie.
- [0198] De anti-myostatine antilichamen van de uitvinding kunnen ook worden toegepast om de niveaus van myostatine in een weefsel of serum vast te stellen. In sommige uitvoeringsvormen, is het weefsel een ziek
 15 weefsel. In sommige uitvoeringsvormen van de werkwijze, wordt een weefsel of een biopsie daarvan uitgesneden uit een patiënt. De werkwijze omvat de stappen van toediening van een detecteerbaar gelabeld anti-myostatine antilichaam of een samenstelling ze omvattende aan een patiënt die zo'n diagnostische test nodig heeft en onderwerpen van de patiënt aan
 20 imaging-analyse om de locatie van de myostatine tot expressie brengende weefsels vast te stellen. Imaging-analyse is goed bekend in de medische kunst, en omvat, zonder beperking, röntgenstraalanalyse, magnetische resonantie-imaging (MRI) of computertomografie (CT). Het antilichaam kan zijn gelabeld met een agens geschikt voor in vivo-imaging, bijvoorbeeld een
 25 contrastagens, zoals barium, welke toegepast kan worden voor röntgenstraalanalyse, of een magnetisch contrastagens, zoals een gadoliniumchelaat, welke kan worden toegepast voor MRI of CT. Andere labellingagentia omvatten, zonder beperking, radio-isotopen zoals ⁹⁹Tc. In een andere uitvoeringsvorm, zal het anti-myostatine antilichaam niet
 30 gelabeld zijn en zal in beeld gebracht worden door toediening van een

tweede antilichaam of ander molecuul dat detecteerbaar is en dat kan binden aan het anti-myostatine antilichaam. In een uitvoeringsvorm, wordt een biopsie verkregen uit de patiënt om vast te stellen of het weefsel van interesse myostatine tot uitdrukking brengt.

5

Therapeutische werkwijzen of toepassing

[0199] In een andere uitvoeringsvorm, verschaft de uitvinding een werkwijze voor het inhiberen van myostatineactiviteit door toediening van een anti-myostatine antilichaam aan een patiënt die het nodig heeft. Eén van de typen van antilichamen hierin beschreven kan therapeutisch worden toegepast. In verschillende uitvoeringsvormen is het anti-myostatine antilichaam een humaan, chimeer of gehumaniseerd antilichaam. In een voorkeursuitvoering, is het myostatine humaan en is de patiënt een humane patiënt. Alternatief kan de patiënt een zoogdier zijn dat een myostatine tot uitdrukking brengt waarmee het anti-myostatine antilichaam kruisreageert. Het antilichaam kan worden toegediend aan een niet-humaan zoogdier myostatine tot uitdrukking brengende waarmee het antilichaam kruisreageert (d.w.z. een rat, een muis of een cynomolgusaap) voor veterinaire doeleinden of als een diermodeel van humane ziekte. Zulke diermodeellen kunnen bruikbaar zijn voor het evalueren van de therapeutische effectiviteit van antilichamen van deze uitvinding.

[0200] Deze antilichamen kunnen worden toegepast in het bevorderen van spiergroei, gewichtstoename en het helpen in de preventie van zwakte in veestapel (rundvee, varkens, schapen, paarden, kippen, kalkoenen en vissen) en gezelschapsdieren (honden, katten en paarden)

[0201] In een andere uitvoeringsvorm, verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bevorderen van spiergroei, gewichtstoename en het helpen in de preventie van zwakte in vee, varkens, schapen, kippen, kalkoenen, paarden, vissen, honden en katten die het nodig hebben

omvattende de stap van toediening aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte zoals hierin beschreven.

[0202] Zoals hierin toegepast, wordt de term "een conditie die kan worden voorkomen of behandeld door het reduceren van myostatineactiviteit"

5 bedoelt te omvatten ziekten en andere aandoeningen waarin de aanwezigheid van hoge niveaus van myostatine in een patiënt die lijdt aan de aandoening getoond of verdacht is ofwel verantwoordelijk te zijn voor de pathofysiologie van de aandoening of een factor die bijdraagt aan een verergering van de aandoening. Zulke aandoeningen kunnen worden
10 aangetoond, b.v., door een toename in de niveaus van myostatine in weefsels en vloeistoffen of gefosforyleerd Smad 2 of 3 in spierweefsel in de aangedane cellen of weefsels van een patiënt die lijdt aan de aandoening. De toename in myostatineniveaus kan worden gedetecteerd, bijvoorbeeld toepassende een anti-myostatine antilichaam zoals boven beschreven.

15 **[0203]** In een andere voorkeursuitvoering, kan een anti-myostatine antilichaam worden toegediend aan een patiënt die ongepast hoge niveaus van myostatine tot uitdrukking brengt. Het is bekend in de kunst dat hoog-niveau expressie van myostatine kan leiden tot een verscheidenheid aan wasting-condities, botverlies en tot accumulatie van vetmassa. In één
20 uitvoeringsvorm, heeft genoemde werkwijze betrekking op de behandeling van ziekten en condities waarin het gewenst is te verminderen het verlies van of te verhogen skeletspiermassa, te verminderen botverlies of te vermeerderen botmassa en/of te reduceren vetmassa door het neutraliseren van de effecten van myostatine. Zulke condities en ziekten zijn bovenstaand
25 genoemd.

[0204] In een andere voorkeursuitvoering, kan een anti-myostatine antilichaam worden toegediend aan een patiënt wie niet ongepaste niveaus van myostatine tot uitdrukking brengt (hoog of laag), maar wiens conditie nog steeds succesvol behandeld of voorkomen zou worden door toepassing
30 van anti-myostatinebehandeling. In één uitvoeringsvorm, heeft genoemde

werkwijze betrekking op de behandeling van ziekten en condities waarin het gewenst is myostatineactiviteit te inhiberen, om het verlies te behandelen van of te verbeteren skeletspiermassa, te behandelen botverlies of botmassa te doen toenemen en/of te behandelen vetmassa door
 5 neutralisatie van de effecten van myostatine. Zulke ziekten en condities zijn bekend in de kunst en zouden omvatten ziekten en condities die associëren met een verscheidenheid aan wasting-condities die kunnen omvatten botverlies en accumulatie van vetmassa, bijvoorbeeld, leeftijdgerelateerde degeneratieve ziekten en niet-degeneratieve, normaal leeftijdgerelateerde
 10 condities.

[0205] Het antilichaam kan eenmalig worden toegediend, maar wordt meer geprefereerd meerdere malen toegediend. Het antilichaam kan worden toegediend van driemaal daags tot eens per zes maanden of langer. Toediening kan zijn op een schema zoals driemaal daags, tweemaal daags,
 15 eenmaal daags, eenmaal per twee dagen, eenmaal per drie dagen, eenmaal per week, eenmaal per twee weken, eenmaal per maand, eenmaal per twee maanden, eenmaal per drie maanden en eenmaal per zes maanden. Het antilichaam kan ook worden toegediend continu via een minipomp. Het antilichaam kan worden toegediend via een orale, mucosale, buccale,
 20 intranasale, inhaleerbare, intraveneuze, subcutane, intramusculaire of parenterale route. Het antilichaam kan worden toegediend eenmaal, ten minste tweemaal of gedurende ten minste de periode van tijd totdat de conditie is behandeld, verzacht of genezen. Het antilichaam zal in het algemeen worden toegediend voor zo lang als de conditie aanwezig is. Het
 25 antilichaam zal in het algemeen worden toegediend als een deel van een farmaceutische samenstelling zoals boven beschreven. De dosering van antilichaam zal algemeen zijn in het bereik van 0,1-100 mg/kg, meer bij voorkeur 0,5-50 mg/kg, meer geprefereerd 1-20 mg/kg, en zelfs meer geprefereerd 1-10 mg/kg. De serumconcentratie van het antilichaam kan
 30 worden gemeten door een werkwijze bekend in de kunst.

[0206] Co-administratie van het antilichaam met een additioneel therapeutisch agens (combinatietherapie) omvat toediening van een farmaceutische samenstelling omvattende het anti-myostatine antilichaam en het additionele therapeutische agens zowel als toediening van twee of

5 meer afzonderlijke farmaceutische samenstellingen, één omvattende het anti-myostatine antilichaam en de ander(e) omvattende het (de) additionele therapeutische agens (agentia). Verder, hoewel co-administratie of combinatietherapie in het algemeen betekent dat het antilichaam en additionele therapeutische agentia worden toegediend op dezelfde tijd als

10 elkaar, omvat het ook gevallen waarin het antilichaam en additionele therapeutische agentia worden toegediend op verschillende tijden. Bijvoorbeeld, kan het antilichaam worden toegediend eenmaal per drie dagen, terwijl het additionele therapeutische agens eenmaal per dag wordt toegediend. Alternatief, kan het antilichaam worden toegediend

15 voorafgaand aan of aansluitend op behandeling van de aandoening met het additionele therapeutische agens, bijvoorbeeld nadat een patiënt niet beter is geworden van therapie met het additionele agens. Vergelijkbaar, kan toediening van het anti-myostatine antilichaam worden toegediend voorafgaand aan of aansluitend op een andere therapie, zoals oefening en/of

20 dieet (inclusief nutritionele) supplementen. Het antilichaam en een of meer additionele therapeutische agentia (de combinatietherapie) kan worden toegediend eenmaal, tweemaal of ten minste de periode van tijd tot de conditie is behandeld, verlicht of genezen. Bij voorkeur wordt de combinatietherapie meerdere malen toegediend. De combinatietherapie kan

25 worden toegediend van driemaal daags tot eenmaal per zes maanden. De toediening kan zijn op een schema zoals driemaal daags, tweemaal daags, eenmaal daags, eenmaal per twee dagen, eenmaal per drie dagen, eenmaal per week, eenmaal per twee weken, eenmaal per maand, eenmaal per twee maanden, eenmaal per drie maanden en eenmaal per zes maanden, of kan

30 worden toegediend continu via een minipomp. De combinatietherapie kan

worden toegediend via een orale, mucosale, buccale, intranasale, inhaleerbare, intraveneuze, subcutane, intramusculaire of parenterale route.

Gentherapie

- 5 **[0207]** De nucleïnezuurmoleculen van de onderhavige uitvinding kunnen worden toegediend aan een patiënt die ze nodig heeft via gentherapie. De therapie kan ofwel in vivo of ex vivo zijn. In een voorkeursuitvoering, worden nucleïnezuurmoleculen coderende voor zowel een zware keten als een lichte keten toegediend aan een patiënt. In een meer geprefereerde
- 10 uitvoeringsvorm, worden de nucleïnezuurmoleculen toegediend zodat zij stabiel geïntegreerd zijn in chromosomen van B-cellen omdat deze cellen gespecialiseerd zijn voor het produceren van antilichamen. In een voorkeursuitvoering, worden precursor-B-cellen of andere cellen getransfecteerd of geïnfecteerd ex vivo en gere-transplanteerd in een patiënt
- 15 die het nodig heeft. In een andere uitvoeringsvorm, worden precursor-B-cellen of andere cellen geïnfecteerd in vivo toepassende een virus bekend het celtype van interesse te infecteren. Typische vectoren toegepast voor gentherapie omvatten liposomen, plasmiden en virale vectoren. Voorbeelden van virale vectoren zijn retrovirussen, adenovirussen en
- 20 adenogeassocieerde virussen. Na infectie ofwel in vivo of ex vivo, kunnen niveaus van antilichaamexpressie worden gemonitord door het nemen van een monster uit de behandelde patiënt en het toepassen van een immunoassay bekend in de kunst of hierin beschreven.
- 25 **[0208]** In een voorkeursuitvoering, omvat de gentherapiewerkwijze de stappen van het toedienen van een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul coderende voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-myostatine antilichaam en het nucleïnezuurmolecuul tot expressie brengende. In een andere uitvoeringsvorm, omvat de gentherapiewerkwijze de stappen van toediening van een geïsoleerd

nucleïnezuurmolecuul coderende voor de lichte keten of een
antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-myostatine antilichaam en
het nucleïnezuurmolecuul tot expressie brengende. In een meer
geprefereerde werkwijze, omvat de gentherapiewerkwijze de stappen van
5 toediening van een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul coderende voor de
zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan en een geïsoleerd
nucleïnezuurmolecuul coderende voor de lichte keten of het
antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-myostatine antilichaam
van de uitvinding en de nucleïnezuurmoleculen tot expressie brengende. De
10 gentherapiewerkwijze kan ook omvatten de stap van toediening van één of
meer additionele therapeutische agentia, zoals deze beschreven,
bovenstaand.

[0209] Opdat deze uitvinding beter zal worden begrepen, worden de
volgende voorbeelden uiteengezet. Deze voorbeelden zijn voor doeleinden
15 van illustratie alleen en moeten niet worden geconstrueerd als op enige
wijze beperkend voor de beschermingsomvang van de uitvinding.

VOORBEELD 1Generatie van hybridoma's die anti-myostatine antilichaam produceren

[0210] Antilichamen van de uitvinding werden bereid, geselecteerd, en onderzocht als volgt: acht tot tien weken oude XenoMous™-muizen werden

5 intraperitoniaal geïmmuniseerd of in hun achterste voetkussentjes met ofwel een c-terminaal matuur myostatine (10 µg per dosis/muis) (R&D Systems, catalogus #788-G8) of met een gehele-lengte cynomolgus matuur myostatine. Deze dosis werd herhaald zevenmaal over een drie tot vier weken periode. Vier dagen voor fusie, kregen de muizen een laatste injectie

10 van het myostatine in PBS. De milt en lymfeknooppolyfocyten van geïmmuniseerde muizen werden gefuseerd met de niet-secreterende myeloma P3 -X63-Ag8.653-celijn, en deze gefuseerde cellen werden onderworpen aan HAT-selectie als eerder beschreven (Galfre en Milstein, Methods Enzymol. 3:3-46, 1981). Een panel van hybridoma's werd

15 teruggewonnen die alle myostatinespecifieke human IgG2- of IgG4-antilichamen uitscheiden.

GDF8 en GDF11 ELISA assayprotocol:

20 [0211] ELISA-assay werd toegepast om antilichaambinding aan myostatine of GDF11 te detecteren. Myostatine of GDF11 werd gecoated op een 96-well Immulon microtiterplaat (NUNC-Immuno™ -plaat MaxiSorp™ -oppervlak, Nalge Nunc International, Cat. Nr.439454) in 4µg/ml in 50mM natriumbicarbonaatbuffer overnacht bij 4°C. Platen

25 werden gewassen, en dan geblocked met fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) omvattende 0,1% Tween-20 en 0,5 bovineserumalbumine. Antilichamen werden toegevoegd aan de geblokkeerde ELISA-platen, geïncubeerd gedurende 1 uur, en gewassen met PBS met Tween-20. Binding werd gedetecteerd door anti-humaan IgG-horseradishperoxidase

30 (Pierce Cat. No. 31420) gevolgd door de toevoeging van ABTS (Pierce Cat.

No. 37615). Colorimetrische metingen werden uitgevoerd bij 405 nm in een microplaatlezer (We gebruikten SpectraMax Plus 384, Molecular Devices).

[0212] Elf hybridoma's werden geselecteerd voor verder onderzoek en warden aangeduid als 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 5 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, en 1_268_1. De elf hybridoma's werden gedeponeerd onder voorwaarden overeenkomstig met het Budapest-verdrag bij de American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 op 10 februari, 2005. De volgende referentienummers zijn toegekend aan de hybridoma's:

10

Antilichaam	Hybridoma Identifier	ATCC
Referentie Nr.		
1_116_1	PF8-1-116-1 (LN 15902)	PTA-6566
1_132_1	PF8-1-132-1 (LN 15903)	PTA-6567
1_136_3	PF8-1-136-3 (LN 15904)	PTA-6568
1_257_1	PF8-1-257-1 (LN 15905)	PTA-6569
1_268_1	PF8-1-268-1 (LN 15906)	PTA-6570
1_314_1	PF8-1-314-1 (LN 15907)	PTA-6571
1_46_1	PF8-1-46-1 (LN 15908)	PTA-6572
1_66_1	PF8-1-66-1 (LN 15909)	PTA-6573
2_112_1	PF8-2-112-1 (LN 15910)	PTA-6574
2_43_1	PF8-2-43-1 (LN 15911)	PTA-6575
2_177_1	PF8-2-177-1 (LN 15912)	PTA-6576

VOORBEELD II

15

Sequences van Anti-myostatine antilichamen bereid volgens de uitvinding

[0213] Om de structuur van antilichamen geproduceerd volgens de uitvinding te analyseren, werden nucleïnezuuren gekloond die coderen voor

zware en lichte keten fragmenten van hybridoma's die anti-myostatine monoklonale antilichamen produceren

[0214] Het kloneren en sequencen van de antilichaamvariabele regio's, werden als volgt bereikt: Poly(A)⁺ mRNA werd geïsoleerd toepassende een
 5 Fast-Track kit (Invitrogen) van ongeveer 2 X 10⁵ hybridomacellen verkregen XenoMouseTM -muizen geïmmuniseerd met myostatine. cDNA werd gesynthetiseerd uit het mRNA door toepassing van willekeurige primers. Het willekeurig geprimeerde cDNA werd geamplificeerd humane V_H of humane V_K familiespecifieke variabele domeinprimers toepassende
 10 (Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes en design of family-specific oligonucleotide probes." *Eur. J. Immunol.* 21:985-991 (1991)) of een universele humane V_H primer [MG-30, 5'-CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG-3'] (SEQ ID NO: 91), in combinatie met
 15 primers specifiek voor de humane Cy2 constante regio, MG-40d [5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3'] (SEQ ID NO: 92) of een C_K constante regio [hκP2; zoals eerder beschreven in Green et al., 1994]. Nucleïnezuurmoleculen werden verkregen die coderen voor humane zware en kappa-lichte ketentranscripten van de antimyostatineproducerende
 20 hybridoma's door PCR-amplificatie van poly(A⁺) RNA de boven beschreven primers toepassende. De PCR-producten werden gekloond in [pCRII (Invitrogen)] een TA kloningkit (Invitrogen) toepassend en beide strengen werden gesequenced Prism dye-terminator sequencing kits (Applied Biosystems Inc) toepassende en een ABI 377 sequencingmachine (Applied
 25 Biosystems Inc). Alle sequenties werden geanalyseerd door alignment aan de "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) MacVector® (Accelrys, San Diego, CA) toepassende en Geneworks® (Hindmarsh, S.A. Australia) softwareprogramma's.

[0215] Om te verkrijgen de gehele lengte tot uitdrukking gebrachte nucleïnezuursequentie van antilichamen geproduceerd volgens de uitvinding, werden nucleïnezuren gekloond die coderen voor gehele-lengte zware en lichte keten coderende regio's van hybridoma's die anti-

5 myostatine antilichamen produceren. Klonering en sequencing werd als volgt bereikt: Poly(A)⁺ mRNA werd geïsoleerd toepassende een RNeasy Mini Kit (Qiagen) en cDNA gesynthetiseerd uit het mRNA met de Advantage RT-for-PCR kit (BD Biosciences) toepassende oligo(dT) priming. Het oligo(dT) geprimede cDNA werd geamplificeerd in twee onafhankelijke

10 reacties gedegenereerde primers toepassende ontworpen om te hybridiseren aan de 5' niet vertaalde regio (5' UTR) van humane V_H of humane V_K gensegmenten (tabel 2A en 2B) in samenhang met niet-gedegenereerde primers specifiek voor regio's in het 3'UTR van IGHG2 of IGHG4 [G_3UTR_R, 5'TACGTGCCAAGCATCCTCGC] (SEQ ID NO: 93) of IGK

15 [K_3UTR_R, 5'AGGCTGGAAGTGGAGGAGCAGGTG] (SEQ ID NO: 94). Amplificatie werd bereikt toepassende de Expand High Fidelity PCR kit (Roche) en een PTC-200 DNA Engine (MJ Research) met cycli als volgt: 2 minuten bij 94°C; 23x (30 seconden bij 94°C, 50 seconden bij 52°C, 2 minuten bij 72°C); 8 minuten bij 72°C. Voor zowel zware als lichte

20 ketenreacties, werden de PCR-producten uit twee onafhankelijke PCR's gekloond in pCR2.1 toepassende een TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) en beide strengen van twee klonen werden gesequenced toepassende Grills 16th BDTv3.1/dGTP chemie (Applied Biosystems Inc) en een 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc).

25

TABEL 2A**Zware en lichte keten 5' amplificatie primers:**

Primernaam	Primersequentie	SEQ ID
VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC	95
VH3a_5UTR_F	HVTHTCCACTYGGTGATCRGCACTG	96
VH3c_5UTR_F	ATTYRGTGATCAGSACTGAACASAG	97
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCYCWWVYCAGGACACAGC	98
VK2_5UTR_F	CACCAGGKGATTTGCATATTRTCCC	99
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYTTG	100

5

TABLE 2B

5' Primers toegepast voor amplificatie van anti-myostatine antilichaam
zware en lichte ketens:

10

Kloon	Voorwaartse zware keten primer	Voorwaartse lichte keten primer
1_116_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_132_1	VH1a_5UTR_F	VK2_5UTR_F
1_136_3	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_257_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_314_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_46_1	VH1a_5UTR_F	VK2_5UTR_F
2_112_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F
1_268_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_66_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
2_177_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F
2_43_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F

Genbenuttingsanalyse

[0216] Van een nucleïnezuursequentie en voorspelde aminozuursequentie van de antilichamen, werd de genbenutting geïdentificeerd voor elke antilichaamketen. Tabel 3 zet uiteen de genbenutting van geselecteerde 5 hybridomaklonen van antilichamen in overeenstemming met de uitvinding:

TABEL 3

Zware en lichte keten gen segment benutting:

Kloon	Zware keten gen benutting					Kappa-keten gen benutting		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	C _H	SEQ ID NO:	V _K	J _K
1_116_1	1	V3-21	D5-5	JH4 B	G2	3	A30	JK1
1_132_1	5	V1-02	D4- 23	JH6 B	G2	7	A3	JK4
1_136_3	9	V3-21	D5-5	JH4 B	G2	11	A30	JK1
1_257_1	13	V3-21	D5- 12	JH6 B	G2	15	A30	JK3
1_314_1	17	V3-21	-	JH6 B	G2	19	A30	JK1
1_46_1	21	V1-02	D4- 23	JH6 B	G2	23	A3	JK4
2_112_1	25	V3-23	D1-7	JH3 B	G4	27	L2	JK4
1_268_1	29	V3-21	D1- 26	JH4 B	G2	31	A30	JK4
1_66_1	33	V3-21	D5-5	JH4 B	G2	35	A30	JK3

2_177_1	37	V3-21	D1-7	JH3 B	G4	39	L2	JK4
2_43_1	41	V3-23	D1-7	JH3 B	G4	43	L2	JK4

[0217] Mutaties die ontwikkelden gedurende antilichaammaturatie van de framework-regio's werden teruggemodificeerd naar de stamlijnsequenties zoals geïllustreerd in de sequentie-alignment van figuur 19. Specifiek, werd residu 12 in de zware keten van monoklonaal antilichaam 2_112_1 (SEQ ID NOs: 26 en 77) gemodificeerd van Ile naar Val. In de lichte keten (SEQ ID NOs: 28 en 79), werd residu 58 gemodificeerd van Phe naar Ile en residu 85 werd gemodificeerd van Ile naar Val. Mutagenese van specifieke residuen van de zware en lichte ketens van antilichaam 2_112_1 werd uitgevoerd door het ontwerpen van primers en toepassende de QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit van Stratagene, volgens de instructies van de producent. Mutaties werden bevestigd door geautomatiseerde sequencing, en gemutageniseerde inserties werden gesubkloond in expressievectoren. Deze expressievectoren werden getransfecteerd in NS0 (ECACC # 85110503) en HEK-293T cellen (American Type Culture Collection) om recombinante antilichamen van de uitvinding tot expressie te brengen. Het resulterende antilichaam hebbende teruggemuteerde frameworkregio's wordt aangeduid als antilichaam 2_112_K.

VOORBEELD III

Inhibitie van myostatine door humane anti-myostatine antilichamen (A204) luciferaseassay

[0218] Een myostatinegevoelig reporter-genassay (see, Thies, et al., *Growth Factors*, (2001) 18:251-259.) werd toegepast om de biologische

activiteit van actief myostatine in vitro vast te stellen. Deze assay past reportervector pGL3(CAGA)₁₅ toe gekoppeld aan luciferase. De CAGA box sequentie (AGCCAGACA) (SEQ ID NO: 101) werd gerapporteerd een TGF- β -gevoelig element te zijn in de promoterregio van een TGF- β -geïnduceerd gen, PAI-1. (Zawel, et al. *Mol. Cell*, (1998) 1:611-617). Deze reportervector werd gegenereerd door insertie van 15 kopieën van CAGA boxes in de SmaI en XhoI plaatsen van pGL3-promotervector (Promega, Cat. No. E1761). De humane rhabdomyosarcomacellijn, A204 (ATCC Cell No. HTB-82), werd kortstondig getransfected met pGL3(CAGA)₁₅ en CMV β -GAL Fugene 6 transfectiereagens toepassende (Roche Diagnostics, Cat. No. 1814443). Getransfecteerde cellen werden gekweekt in McCoy's 5A medium (Invitrogen, Cat. No. 16600) gesupplementeerd met 10% foetaal bovineserum, 100 U/ml streptomycine, en 100 μ g/ml penicilline gedurende 16 uur. Cellen werden gewisseld naar uithongerend medium (McCoy's 5A medium met streptomycine, penicilline, en 1mg/ml bovineserumalbumine), en daarna behandeld met myostatine, GD11, of activine gedurende 6 uur bij 37°C. Luciferaseactiviteit werd gemeten toepassende het Dual-light® luciferaseassaysysteem (Applied Biosystems, Cat. No. T1004). Myostatine activeert de reporter tot ongeveer 10 maal met EC50 rond 8 ng/ml. GDF11 activeert de reporter in de erg vergelijkbare respons. De neutralisatieactiviteit van een antilichaam werd vastgesteld door het antilichaam vooraf te incuberen met myostatine gedurende 30 minuten voorafgaand aan toevoeging aan de A204 cellen. Zoals getoond in figuur 1, inhibeerden humane anti-myostatine antilichamen van de uitvinding myostatine gestimuleerde luciferaseactiviteit in de A204 cellen. Een vergelijkbaar experiment GDF11 toepassende werd ook uitgevoerd om de specificiteiten van de antilichamen van de uitvinding te bestuderen. De gegevens zijn opgesomd in de figuur 1. Meeste antilichamen hebben veel meer potente neutraliserende activiteit tegen GDF8 dan GDF11.

Monoklonale antilichamen 1_46_1 en 1_132_1 neutraliseren zowel GDF8 als GDF11 met gelijke potentie.

VOORBEELD IV

Inhibitie van myostatine door humane anti-myostatine antilichamen

5 (L6 beta-lactamaseassay)

[0219] *In vitro* assays om myostatinebinding aan type II-membraanreceptoren te meten in de aanwezigheid van anti-myostatine antilichamen werden uitgevoerd om vast te stellen of de anti-myostatine
10 antilichamen in staat waren zulke binding te inhiberen en hun mate van inhibitie.

[0220] Een L5 Aurora-reporterassay werd uitgevoerd om de biologische activiteit van actieve myostatine *in vitro* vast te stellen. L6 myostatine LD10 is een cellijn stabiel tot expressie brengende een beta-
15 lactamasereporter gen. De promoterregio in de ingevoegde reporter bestaat uit 16 kopieën van Smad-bindend element (SBE, GTCTAGAC (SEQ ID NO: 102), Zawel et al., Mol. Cell 1: 611-17 (1998)). De cellen werden gekweekt in DMEM hoog glucose (Invitrogen, Cat. No. 11995) gesupplementeerd met
20 10% hitte geïnactiveerd foetaal bovineserum (FBS), 200-400 µg/ml Zeocin, 100 U/ml streptomycine en 100 µg/ml penicilline. Cellen werden uitgeplaat op 96 wells platen op dag één en veranderd naar het uithongermedium DMEM met Zeocin, streptomycine, penicilline en 0,1% FBS) in de middag van de tweede dag. Op de morgen van de derde dag, werden de cellen behandeld met myostatine, GDF11, of activine gedurende 4 uur bij 37°C.
25 Aurora CCF2 loading kit werd toegepast om beta-lactamaseactiviteit te analyseren volgens de suggestie van de fabricant (Invitrogen, Cat. No. K1032).

[0221] Myostatinegeactiveerde smad-gemedieerde expressie van de reporter tot ongeveer 2-3-maal met EC50 rond 5 ng/ml. GDF11 en activine activeerden de reporter in de erg vergelijkbare respons.

[0222] De neutralisatie activiteit van een antilichaam werd vastgesteld door antilichaam voorafgaand met myostatine te incuberen gedurende 30 minuten voorafgaand aan toevoeging aan de L6 myostatine LD10-cellen. Zoals getoond in figuren 2 en 11, testen alle humane anti-myostatine antilichamen geïnhibeerde smad-proteïneactivatie in een bereik van ongeveer 1 tot ongeveer 225 nM.

10

VOORBEELD V

Inhibitie van myostatinegeïnduceerde Smad 2-fosforylatie

(Western Blot)

15

[0223] HepG2 humane hepatocellulaire carcinoomcellen (ATTC Cell No. HB-8065) werden gekweekt in DMEM hoog-glucose (Invitrogen, Cat. No. 11995) gesupplementeerd met 10% foetaalbovineserum (FBS), 100 U/ml streptomycine, en 100 µg/ml penicilline. 60-70% confluent cellen werden veranderd naar het uithongermedium (DMEM met streptomycine, penicilline, en 0.5% FBS) overnacht. Cellen werden behandeld met myostatine gedurende 30 minuten. De neutraliserende activiteit van een antilichaam werd vastgesteld door antilichaam vooraf te incuberen met myostatine gedurende 30 minuten voorafgaand aan toevoeging aan de HepG2 cellen. Cellen werden gelyseerd voor Western blot. Gefosforyleerd Smad2 werd gedetecteerd toepassende een konijne-anti-fosfo-Smad2-antilichaam (Cell Signalling, Cat. No. 3101), welke dan werd gedetecteerd door antikoniijn Alex 680 (Moleculaire Probes, Cat. No. A21076). De hoeveelheid van gefosforyleerd Smad2 werd gekwantificeerd toepassende Odyssey Infrared Imager (Li-Cor). Glyseraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase

30

(GAPDH) werd toegepast voor normalisatie. Zoals getoond in figuur 3, inhibeerden alle van de geteste neutraliserende humane anti-myostatine antilichamen Smad2-fosforylatie.

5 VOORBEELD VI

Versterkte expressie van *myf5* door humane anti-myostatine antilichamen

[0223] C2C12 myoblastsen (ATCC Cel No. CRL-1772) werden gekweekt in DMEM hoog-glucose (Invitrogen, Cat. No. 11995) gesupplementeerd met
 10 10% foetaal bovineserum (FBS) en 100 µg/ml streptomycine en 100 µg/ml penicilline. Cellen werden behandeld met 300 ng/ml myostatine gedurende 2 uur. De neutraliserende activiteit van een antilichaam werd vastgesteld door antilichaam te preïncuberen met myostatine gedurende 30 minuten voorafgaand aan toevoeging van de C2C12 cellen. Cellen werden geoogst en
 15 RNA gezuiverd toepassende RNeasy miniprep kit (Qiagen Cat. No. 74104). Gezuiverd RNA werd gekwantificeerd met RiboGreen® RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Cat. No. R11490). Gelijke hoeveelheid van totaal RNA werd toegepast voor real time PCR-analyse om *myf5*-expressie te detecteren. Primer/probe sets voor muis *myf5* RNA detectie werden
 20 gekocht van Assays-On-Demand™-gen expressie producten (Applied Biosystems, Cat. No. Hs00271574_m1). Assaycondities toegepast waren volgens de aanbevelingen van de productent. Eenstaps RT-PCR werd gedraaid op het sequentie detectiesysteem ABI7900 (Applied Biosystems). Zoals getoond in figuur 4, versterkten neutraliserende humane anti-
 25 myostatine antilichamen van de uitvinding *myf5*-expressie. Eén niet-neutraliserend humaan anti-myostatine antilichaam, 1_159_1, versterkte niet *myf5*-expressie.

VOORBEELD VIIVersterking van celdifferentiatie door humane anti-myostatine antilichamen

- 5 **[0225]** De mogelijkheid van antilichamen om myostatine-gemedieerde
inhibitie van myoblastdifferentiatie te inhiberen werd vastgesteld in C2C12-
myoblasten. C2C12-cellen werden uitgeplaat in 96 wells platen bij 25000
cellen per well in 200 µl DMEM/20% FBS/Penn-Strip. Vierentwintig uur
later, werd het medium opgezogen, de cellen gewassen eenmaal met HIT-
10 medium DMEM/2% paardeserum/Penn-Strep), en 200 µl MIT-medium
alleen of gesupplementeerd met 300 ng/ml GDF-8 (R&D Systems) alleen of
met verschillende concentraties van toegevoegd antilichaam. Achtenveertig
uur later, werd het medium opgezogen en de cellen gelyseerd in 100 µl van
lysisbuffer (25 mM Tris pH 7,5, 3 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholaat,
15 0,1% SDS en 1 tablet van Roche Complete protease-inhibitor/25 ml van
lysisbuffer). Embryonale myosine zware keten (MHC)-niveaus in de lysaten
werden vastgesteld door spotting van 5 µl lysaat in individuele wells van
High Bind MA6000 platen (MSD#P11XB-1, Meso Scale Discovery, MSD),
drogen aan de lucht gedurende 1 uur, toevoegen 100µl van Blocker A
20 (MSD#R93BA-2), incuberen gedurende 1 uur bij 25°C met schudden,
wassen 4x met PBS/0,05% Tween-20, toevoegen 50 µl van embryonaal MHC
antilichaam (geconditioneerde media van ATCC #CRL-2039 hybridoma),
incuberen gedurende 1,5 uur bij 25°C met schudden, wassen 4x zoals
hiervoor, toevoegen 50 µl van Sulfo-TAG Anti-Mouse IgG (MSD #R32AC)
25 welke verdund was 1:1000 in antilichaamoplosmiddel (MSD #R50AA-2),
incuberen gedurende 1,5 uur bij 25°C met schudden, wassen 4x zoals
hiervoor, toevoegen 150 µl van 1x Read Buffer (MSD#R92TC-2) en
analyseren chemoluminescentie in een Sector Imager 6000 (MSD). Zoals
getoond in figuur 5, keerden neutraliserende humane anti-myostatine

antilichamen myostatine geblokkeerde spierdifferentiatie om in de MHC-assay.

VOORBEELD VIII

5 Myostatinepeptidebinding

[0226] Elf peptiden werden gegenereerd uit matuur GDF8 om antilichaambinding te testen en localiseren (zie figuur 6) . Peptide-ELISA werd uitgevoerd op glutaraldehyde gecoate ELISA-platen en op ongecoate
 10 ELISA-platen (NUNC-Immuno™-plate MaxiSorp™-oppervlak, Nalge Nunc International, Cat. No. 439454). Glutaraldehyde gecoate platen werden bereid door het mixen van 250 µl glutaraldehyde (50% w/v) met 50 ml gedeïoniseerd water en het toevoegen van 200 µl van de oplossing in elke well. Platen werden geïncubeerd gedurende ten minste 1 uur bij
 15 kamertemperatuur. Het glutaraldehyde werd uit de plaat geschud en omgekeerd neergeslagen op papieren doekjes om alle vloeistof te verwijderen voorafgaand aan toepassing.

[0227] ELISA-platen werden gecoat met peptide met 1,0 µg/well/50 µl (in natriumbicarbonaatbuffer, pH 9,6) gedurende ten minste 4 uur, en daarna
 20 geblokkeerd met 200 µl blocker (1% BSA, 1% ethanolamine pH 7,4) gedurende minimaal 4 uur. Platen werden gewassen met PBST driemaal met 200 µl/well. 50 µl antilichaam (1 µg/ml in PBST, fosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS) met 0,05% Tween-20)-monster werd toegevoegd aan de wells gedurende 1 uur. Platen werden daarna gewassen met PBST
 25 driemaal. 50 µl anti-humaan IgG-horseradishperoxidase (HRP) Pierce, Cat# 31420) verdund in PBST wordt toegevoegd gedurende nog een uur. De wells werden weer gewassen met TBST driemaal, en daarna tweemaal met gedeïoniseerd water. 50 µl ABTS (MOSS) werd toegevoegd gedurende 5 - 20 minuten, en het signaal werd gedetecteerd bij 405 nm in een colometrische

plaatlezer. De resultaten van het bindingsexperiment zijn getoond in figuur 6. De elf peptiden zijn getoond in figuur 7.

VOORBEELD IX

5 Epitope mapping studies

[0228] Kruiscompetitie-experimenten werden uitgevoerd toepassende het BIACORE™ 3000 instrument (Biacore International AB, Uppsala, Sweden en Piscataway, N.J), de protocollen van de producent volgende.

- 10 [0229] Experimenten werden uitgevoerd in een BIACORE™ 3000 instrument bij 25°C in 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20. Myostatine werd geïmmobiliseerd op een CM5 chip (Biacore™) standaard amine koppelingsprocedures toepassende opbrengende ongeveer 1300 RU (resonantieunits). Antilichaammonsters
- 15 werden bereid bij 50 nm en geïnjecteerd in paren, bijvoorbeeld, een referentie-mAB werd geïnjecteerd gedurende 10 minuten gelijk gevolgd door een 10 minuut injectie van een test-mAB. Het oppervlak werd geregenereerd en de injecties werden herhaald in omgekeerde volgorde. De procedure werd herhaald voor alle mogelijke paren van antilichamen. Een
- 20 kruisvergelijking van de totale respons verkregen voor een paar van antilichamen met dat verkregen voor duplicaatinjecties van elk individueel antilichaam werd toegepast om antilichamen te vinden die competitief binden met elkaar, bijvoorbeeld, de antilichaam wedijveren voor binding met het antigeen. Een respons groter dan dat geobserveerd voor een van de
- 25 duplicaatinjecties was indicatief voor binding aan verschillende epitopen terwijl een respons tussenliggend aan deze geobserveerd voor de duplicaatinjecties indicatief was voor binding aan dezelfde of overlappende of naastliggende epitopen. De resultaten van dit experiment zijn getoond in figuur 8 en samengevat in figuur 13.

VOORBEELD XImmunoprecipitatie van myostatine uit celkweekmedium

[0230] Een immunoprecipitatiestudie werd uitgevoerd om de binding van
 5 myostatine antilichamen aan matuur GDF3 en matuur
 GDF8/propeptidecomplex te testen. 293T-cellen werden getransfecteerd met
 GDF-8-expressieconstruct. Geconditioneerd medium werd geoogst 7 dagen
 na transfectie, welke matuur GDF8 en latent complex omvatte. 100 µl
 geconditioneerd medium werd geïncubeerd met 10 µg myostatine
 10 antilichamen gedurende 16 uur bij 4°C. Protein A Dynabeads (Dynal,
 Noorwegen) werden toegevoegd en geïncubeerd gedurende 90 minuten bij
 4°C. Het immunoprecipitaat werd verzameld MPC-E-magnetische
 concentrator toepassende (Dynal, Noorwegen), en viermaal met PBS
 gewassen. Het immunoprecipitaat werd geresuspendeerd in de reducerende
 15 monsterbuffer en geladen op 4-12% Bis-Tris-Nu-Page-gel (Invitrogen).
 Western blotting werd uitgevoerd Odyssey-infrarood-imagingsysteem
 toepassende (Li-Cor). Matuur GDF8 en ongeprocessed GDF8 werden
 gedetecteerd met anti-myostatine antilichaam toepassende (R&D Systems,
 Cat# AF788). Konijne anti-propeptide polykonaal antilichaam (gemaakt in-
 20 huis) werd toegepast om zowel propeptide als ongeprocessed GDF8 te
 detecteren. Zoals getoond in het figuur 9, immunoprecipiteerden
 antilichamen 2_112_1, 2_43_1, en 2_177_1 matuur GDF8, matuur
 GDF8/propeptidecomplex, en ongeprocessed GDF8; antilichaam 1_66_1
 immunoprecipiteerde matuur GDF8 en matuur GDF8/propeptidecomplex.
 25 Geen andere antilichamen immunoprecipiteerden matuur GDF8,
 propeptide of niet-geprocessed GDF8. Lane 4 is de 1/10-mediumgeladen
 controle, en lane 7 is immunoprecipitatiecontrole met medium alleen..

VOORBEELD XI

Immunoprecipitatie van myostatine uit muizenserum

[0231] Een immunoprecipitatiestudie werd uitgevoerd om de binding van myostatine antilichamen aan matuur GDF8 uit muizenserum te testen. 200 μ l muizenserum (Rockland, Cat # D208-00) werd geïncubeerd met 20 μ g myostatine antilichamen gedurende 16 uur bij 4°C. Protein A Dynalbeads werden toegevoegd en geïncubeerd gedurende 90 minuten bij 4°C. Het immunoprecipitaat werd verzameld MPC-E magnetische concentrator (Dynal, Noorwegen) toepassende, en viermaal met PBS gewassen. Het immunoprecipitaat werd geresuspendeerd in de reducerende monsterbuffer en geladen op 4-12% Bis-Tris-Nu-Page-gel (Invitrogen). Wester blotting werd uitgevoerd Odessey infrared imaging-systeem toepassende (Li-Cor). Matuur GDF8 werd gedetecteerd gebiotinyleerde geit anti-myostatine antilichaam toepassende (R&D Systems, Cat.# BAF788). Zoals getoond in figuur 10, antilichamen 2_112_1, 2_43_1, en 2_177_1 immunoprecipiteerde matuur GDF8 uit het muizenserum, terwijl 1_116_1 en 1_66_1 het niet konden. Het is bekend dat matuur GDF8 in het serum bindt aan vele inhibitoire eiwitten zoals propeptide, FLRG, en GASAP1 (Hill et al. (2002) The myostatin propeptide en the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. J. Biol. Chem. 277: 40735-40741. Hill et al. (2003) Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor en follistatin domains. Mol. Endocrin. 17(6): 1144-1154). Dit experiment geeft aan dat antilichamen 2_112_1, 2_43_1, en 2_177_1 ware niet-competitieve neutraliserende antilichamen zijn, d.w.z., de antilichamen neutraliseren myostatine maar blokkeren niet binding van inhibitoire bindende eiwitten aanwezig in serum. Zulke niet-competitieve neutraliserende antilichamen zouden in vivo voordelig zijn.

VOORBEELD XII

Vergelijking van anti-myostatine antilichamen in vivo

[0232] Vijf weken oude KKA^{y/a} -muizen (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine)) werden behandeld met 10 mg/kg monoklonale antilichamen 2_43_1, 2_177_1, en 2_112_K of drager (PBS) toegediend subcutaan eenmaal per week gedurende vijf weken. Aan het einde van de studie werden dieren geëuthaneseerd en de gastrocnemius -plantaris-soleus (GPS), tibialis anterior (TA) en quadriceps (Quads) spiergroepen werden gedissecteed en gewogen. Behandeling met het 2_112_k antilichaam liet significant toenemen ($p < 0.05$) absolute spiermassa voor de GPS (+15.5%) en Quads (+30.6%). Het 2_177 antilichaam liet alleen significant toenemen Quads (+11.5%). Hoewel TA toenam na behandeling met antilichaam 2_112_K (+16.8%), was de toename niet statistisch significant ($p = 0.330$). Lichaamsgewicht nam toe gedurende de 5 weken maar was niet significant verschillend tussen behandelingsgroepen op enig moment gedurende de studie. Wanneer spiermassa werd gecorrigeerd voor lichaamsgewicht (spiermassa index) waren er alleen significante verschillen met 2_112_K behandeling (+11.4% in GPS en +20.6% in Quads). De resultaten van dit experiment zijn getoond in figuren 14 en 15.

20

VOORBEELD XIII

In vivo farmacologie en werkzaamheid van antilichaam

[0233] De in vivo farmacologie en werkzaamheid van antilichaam 2_112_K werd geëvalueerd in muizen. Om potentiële immunomodulatie als gevolg van een muis anti-humaan antilichaam (MAHA) respons te vermijden, werden in vivo studies uitgevoerd in immuundeficiënte Severe Combined Immunodeficient (SCID) beige muizen. Subcutane toediening van antilichaam 2_112_K aan deze muizen bij 10 mg/kg/week subcutaan gedurende 5 weken liet skeletspiermassa toenemen met 19-25% en spiersterkte met ongeveer 15%. Het verlengen van de duur van deze

30

behandeling tot 10 weken resulteerde in een verdere toename in spierssterkte tot 21% maar geen verdere toename in spiermassa (met 18-27%). Tevens, leverde de dosis van 50 mg/kg/week subcutaan gedurende 10 weken niet superieure toenames in spiermassa of -sterkte vergeleken met 10 mg/kg/week. De resultaten van dit experiment zijn getoond in figuur 16.

VOORBEELD XIV

Dosis en concentratie respons effecten

- 10 [0234] Wanneer subcutaan toegediend aan SCID-muizen bij doses variërende van geen effect tot maximaal mogelijke doses (0.01, 0.1, 1 en 10 mg/kg/week), liet antilichaam 2_112_K dosis-afhankelijk skeletspiermassa toenemen met ongeveer 0%, 3%, 7% en 28%, respectievelijk na 5 weken (figuur 17). Het verlengen van de duur van behandeling tot 10 weken
- 15 resulteerde niet in een verdere toename in spiermassa maar neigde tibialis-spiersterkte marginaal te laten toenemen met een additionele 5%. Tevens, veranderde het antilichaam dosisafhankelijk de lichaamsvetsamenstelling van deze muizen met +10%, +1%, -10%, -22% vergeleken met PBS-controles bij de 0.01, 0.1, 1.0 en 10 mg/kg/week gedurende 5 weken..
- 20 [0235] Niet-lineaire, vierparameteranalyse van de dosis- en concentratieresponsgegevens brachten geschatte ED50- en EC50-waarden op van 3,6 mg/kg/week en 20,4 mg/ml (~136 nM), respectievelijk, aannemende dat de toename in spiermassa bereikt met de 10 mg/kg/week dosis het maximaal mogelijke is. De relatie tussen de dosis of
- 25 serumconcentratie van antilichaam 2_112_K versus veranderingen in spiermassa zijn getoond in figuur 18.

VOORBEELD XV

Werkzaamheid van antilichaam voor attenuatie van "muscle wasting"

[0236] Tien weken oude KK-muizen (JAX laboratories, Bar Harbor, Maine) werden willekeurig verdeeld in drie groepen: placebo/drager, cortison/drager en cortisone/antilichaam 2_112_K. Muizen werden subcutaan gedoseerd met ofwel drager (PBS) of 10 mg/kg antilichaam 2_112_K gedurende vijf weken gevolgd door implantatie van een placebo of cortisonpellet. Vijf dagen later, werden muizen geëuthaneseerd, opgeofferd en spiermassa en vetkussentjemassa werden vastgesteld. Om spiermassa vast te stellen, werden de gastrocnemius-plantaris-soleus (GPS), tibialis anterior (TA) en quadriceps (quads) spiergroepen gedissecteed en gewogen. Cortisonimplantaat resulteerde in een significante afname ($p < 0,05$) in spiermassa tot $85,1 \pm 2,2\%$ (GPS), $85,5 \pm 3,9\%$ (TA) en $84,1 \pm 3,7\%$ (quads) van het placebo/dragniveau. Behandeling met antilichaam 2_112_K verzachtte geheel de cortison-geïnduceerde wasting van placebo/dragniveau voor GPS ($102,0 \pm 2,2\%$), TA ($99,5 \pm 3,6$) en quads ($104,6 \pm 2,8\%$). Waarden waren vergelijkbaar wanneer genormaliseerd per gram lichaamsgewicht. Om te testen of dit effect specifiek was voor spiermassa, werd vetkussentjemassa vastgesteld. Voor vetkussentjemassa, werden inguinale, epididymale en abdominale vetkussentjes gedissecteed en gewogen. Behandeling met antilichaam 2_112_K spaarde niet significant ($p < 0,05$) het verlies in vetkussentjemassa als gevolg van cortisonimplantaat voor inguinale, (cortison/drager ($75,1 \pm 4,7\%$) en cortison/2_112_K, ($82,3 \pm 5,3\%$)), epididymale (cortison/drager ($79,3 \pm 5,0\%$) en cortison/2_112_K ($87,1 \pm 3,9\%$)), of abdominale, (cortison/drager ($79,5 \pm 5,5\%$) en cortison/2_112_K ($82,2 \pm 4,2\%$)), vetkussentjes. Waarden zijn uitgedrukt vergeleken met placebo/drager vetkussentje. De resultaten van dit experiment zijn getoond in figuren 20A en 20B.

VOORBEELD XVI

Eiwit A zuivering van myostatine antilichaam

[0237] 1-2 liter geconcentreerd (10-voudig) HEK293 medium werd gefilterd (2 micron) en geladen op een uitgebalanceerde eiwit A kolom (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (53 mLs, uitgebalanceerd met 5 kolomvolumes van D-PBS, pH 7.0) bij 2 mL/min. De kolom werd gewassen met 5 kolomvolumes acetaatbuffer (20 mM natriumacetaat, pH 5.5) en het eiwit uitgespoeld met 4 kolomvolumes van pH 3,2-3,5 natriumacetaat (20 mM). De pH van het eluaat werd aangepast tot pH 5,5 met natriumhydroxide en gefilterd indien nodig. Uiteindelijk werd het materiaal geconcentreerd tot 10 mg/ml, gedialyseerd in 140 mM natriumchloride, 20 mM natriumacetaat, pH 5,5, gefilterd en opgeslagen bij 4°C.

[0238] Alle publicaties en octrooiaanvragen geciteerd in deze beschrijving zijn hierin opgenomen door referentie alsof elke individuele publicatie of octrooiaanvraag specifiek en individueel was aangegeven door referentie opgenomen te zijn. Hoewel de voorgaande uitvinding in enig detail is beschreven door middel van illustratie en voorbeeld voor doeleinden van helderheid van begrip, zal het direct duidelijk zijn aan deze van normale vaardigheid in de kunst in het licht van de lessen van deze uitvinding dat bepaalde veranderingen en modificaties daartoe kunnen worden gemaakt zonder af te wijken van de geest of omvang van de toegevoegde conclusies.

Vertaling van de figurenFiguren 1, 2

Fold activation = maal activatie

Figuur 3

5 $\mu\text{g/ml}$ antibody = $\mu\text{g/ml}$ antilichaam

Figuren 4A en 4B

Relative mRNA = relatief mRNA

Figuren 5A en 5B

Plate = plaat

10 Log concentration = logconcentratie

Figuur 6

Myostatin = myostatine

Peptide bound = peptidegebonden

15 Figuur 7

Peptide number = peptidenummer

Amino acid sequence = aminozuursequentie

Figuur 9

Unprocessed GDF8 = niet-geprocessed GDF8

Mature GDF8 = matuur GDF8

Medium only = medium alleen

5

Figuur 12

Clone = kloon

GDF11 activity = GDF11 activiteit

inhibition at = inhibitie bij

10 no inhibition at = geen inhibitie bij

Figuur 13

Yes = ja

No = nee

15

Figuur 14

Muscle mass = spiermassa

Veh = drager

Figuur 15

20 Muscle mass index = spiermassaindex

Figuren 16A en 16B

Skeletal muscle weight = skeletspiermassa

Increase in weight vs. PBS control = toename in gewicht vs. PBS

5 controle

5-weeks = 5 weken

10-weeks = 10 weken

Tibialis muscle strength = tibialis spiersterkte

Figuren 17A en 17B

10 Tibialis muscle = tibialis spier

Weight = gewicht

Muscle complex = spiercomplex

Figuren 17C en 17D

15 Quadriceps muscle = quadricepsspier

Weight = gewicht

Pooled skeletal muscle = gepoold skeletspier

Figuur 18A

Dose-response

= dosisrepons

% Weight change vs. PBS

= % gewichtsverandering vs. BPS

5 Figuur 18B

Concentration-response

= concentratierespons

Figuren 19A en 19B

Antibody

= antilichaam

10 Figuur 20A

Muscle mass

= spiermassa

Veh

= drager

Cortisone

= cortison

Figuur 20B

15 Adipose mass

= vetmassa

Inguinal

= inguinaal

Epididymal

= epididymaal

Abdominal

= abdominaal

Cortisone

= cortison

20 Veh

= drager

Conclusies

1. Een humaan, chimeer of gehumaniseerd monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan dat specifiek bindt aan
5 myostatine, waarin genoemd antilichaam of gedeelte selectief ten minste 50-maal meer myostatine bindt dan GDF11, waarin genoemd antilichaam of gedeelte myostatinebinding aan een activine type I of type II receptor inhibeert, en waarin genoemd antilichaam een niet-competitief neutraliserend antilichaam is.
10
2. Een farmaceutische samenstelling omvattende een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte volgens conclusie 1 en een farmaceutisch acceptabele drager.
- 15 3. Een werkwijze omvattende de stap van het toedienen aan een patiënt van een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte volgens conclusie 1 of de farmaceutische samenstelling van conclusie 2, waarin genoemd antilichaam, antigeenbindend gedeelte of farmaceutische samenstelling myostatine activiteit inhibeert, waarin genoemde patiënt
20 het nodig heeft spiermassa te laten toenemen, het promoten van skeletspierontwikkeling, het behandelen van een "muscle wasting"-ziekte of het versterken van skeletspiergroei.
4. Een geïsoleerde cellijn die een antilichaam of antigeenbindend
25 gedeelte volgens conclusie 1 produceert of de zware keten of lichte keten van genoemd antilichaam of genoemd antigeenbindend gedeelte.

5. Een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul omvattende een nucleotidesequentie die codeert voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan of de lichte keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan van een antilichaam volgens conclusie

5 1.

6. Een werkwijze omvattende het toedienen aan een patiënt van een antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan volgens conclusie 1, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte

10 myostatineactiviteit inhibeert, waarin genoemde patiënt het nodig heeft glucosehomeostase te verbeteren, vetmassa te verminderen, insulinegevoeligheid toe te laten nemen, nierfunctie te verbeteren, vetaccumulatie af te laten nemen, een ziekte of conditie gekarakteriseerd door botverlies, genoemde ziekte of conditie omvattende osteoporose,

15 osteopenie, osteoarthritis en botfracturen te behandelen, te voorkomen of te inhiberen, metaboolsyndroom te behandelen, "muscle wasting" tegen te gaan door gedurende toediening van een glucocorticoïd of een steroid hormoon gedurende de tijd dat genoemde patiënt behandeling ondergaat met een glucocorticoïd of een steroid hormoon.

20

7. Een werkwijze voor het reduceren van myostatineactiviteit in een patiënt die het nodig heeft omvattende het toedienen aan genoemde patiënt van een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan volgens conclusie 1, waarin genoemd monoklonaal antilichaam of

25 antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.

8. Een werkwijze voor het omkeren van leeftijdsgerelateerde afname in spiermassa in een patiënt die het nodig heeft omvattende het toedienen aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens conclusie 1, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.
- 5
9. Een werkwijze voor het bevorderen van spiergroei, gewichtstoename of het helpen in de preventie van zwakte in vee, varkens, schapen, kippen, kalkoenen, paarden, vissen, honden en katten die het nodig hebben, omvattende de stap van toediening aan genoemde patiënt van een antilichaam of antigeenbindend gedeelte volgens conclusie 1, waarin genoemd antilichaam of antigeenbindend gedeelte myostatineactiviteit inhibeert.
- 10
10. Het antilichaam volgens conclusie 1, dat een K_D heeft dat tussen 1 pM en 500 pM is.
- 15

SEQUENCE LISTING

<110> PFIZER, INC.

AMGEN FREMONT INC.

<120> ANTILICHAMEN TEGEN MYOSTATINE

<130> ABX-PF7 AW

<140>

<150> 60/674,933

<151> 2005-04-25

<160> 122

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 3 00
gggtacagct atggtcttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcggtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcaca gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt caggtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgctc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtcaag 96 0
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 114 0
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga                                     1338

```

<210> 2

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

1031674

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr lie Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin
405 410 415

Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 3

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgctttag gctgggtatca gcagaaacca 12 0
gggaaagccc ctacagcgcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 24 0
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 3 00
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly He Arg Asn Ala
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gin Arg Leu lie
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu lie Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctcttgata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 24 0
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atcactgtgc gagaaatacg 3 00
 gtgggaagtg ggtactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaagggac caggtcacc 360
 gtctctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
 acccagacct acactgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 66 0
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca cgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 780
 gtcacgtcgc tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtag 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gcaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

accaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacaccctgc	cccatcccg	ggaggagatg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacacc	tcccatgctg	1200
gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aagctcaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	1320
aagagcctct	ccctgtctcc	gggtaaatga				1350

<210> 6

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gin Val	Gin Leu	Val Gin	Ser Gly	Ala Glu	Val Lys	Lys Pro	Gly Ala		
1	5				10			15	
Ser Val	Lys Val	Ser Cys	Lys Ala	Ser Gly	Tyr Thr	Phe Thr	Gly Tyr		
	20			25			30		
Tyr Met	His Trp	Val Arg	Gin Ala	Pro Gly	Gin Gly	Leu Glu	Trp Met		
	35		40			45			
Gly Trp	lie Asn	Pro Asn	Asn Gly	Gly Thr	Asn Tyr	Ala Gin	Lys Phe		
	50		55			60			
Gin Gly	Arg Val	Thr Met	Thr Arg	Asp Thr	Ser lie	Ser Thr	Ala Tyr		
65		70			75			80	
Met Glu	Leu Ser	Arg Leu	Arg Ser	Asp Asp	Thr Ala	Val Tyr	His Cys		
		85		90				95	
Ala Arg	Asn Thr	Val Gly	Ser Gly	Tyr Tyr	Tyr Tyr	Gly Met	Asp Val		
	100			105		110			
Trp Gly	Gin Gly	Thr Thr	Val Thr	Val Ser	Ser Ala	Ser Thr	Lys Gly		
	115		120			125			
Pro Ser	Val Phe	Pro Leu	Ala Pro	Cys Ser	Arg Ser	Thr Ser	Glu Ser		
	130		135			140			
Thr Ala	Ala Leu	Gly Cys	Leu Val	Lys Asp	Tyr Phe	Pro Glu	Pro Val		
145		150			155			160	
Thr Val	Ser Trp	Asn Ser	Gly Ala	Leu Thr	Ser Gly	Val His	Thr Phe		
	165			170				175	
Pro Ala	Val Leu	Gin Ser	Ser Gly	Leu Tyr	Ser Leu	Ser Ser	Val Val		
	180			185		190			
Thr Val	Pro Ser	Ser Asn	Phe Gly	Thr Gin	Thr Tyr	Thr Cys	Asn Val		
	195		200			205			
Asp His	Lys Pro	Ser Asn	Thr Lys	Val Asp	Lys Thr	Val Glu	Arg Lys		
210			215			220			
Cys Cys	Val Glu	Cys Pro	Pro Cys	Pro Ala	Pro Pro	Val Ala	Gly Pro		
225		230			235			240	

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

<210> 7

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gatattgtga	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccctggaga	gccggcctcc	60
atctcctgca	ggtctagtca	gagcctcctg	catagtaatg	gatacaacta	tttggattgg	120
tacctgcaga	agtcagggca	gtctccacag	ctcctgatcc	atttggttc	taatcgggcc	180
tccggggtcc	ctgacaggtt	cagtggcagt	ggatcaggca	cagattttac	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgttggggtt	tattactgca	tgcaagttct	acaaactccg	300
ctcactttcg	gcggagggac	caaggtggag	atcaaacgaa	ctgtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtgga	aggtggataa	cgccctccaa	480

7/66

```
tcgggtaact  ccaggagag  tgtcacagag  caggacagca  aggacagcac  ctacagcctc  540
agcagcaccc  tgacgctgag  caaagcagac  tacgagaaac  acaaagtcta  cgctgcgaa   600
gtcaccatc  agggcctgag  ctgcccgtc  acaaagagct  tcaacagggg  agagtgttag   660
```

<210> 8

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Asp lie Val Met Thr Gin Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1           5                               10           15

Glu Pro Ala Ser lie Ser Cys Arg Ser Ser Gin Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gin Lys Ser Gly Gin Ser
      35           40           45

Pro Gin Leu Leu lie His Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
      50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys lie
      65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gin Val
          85           90           95

Leu Gin Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys
      100           105           110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe He Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115           120           125

Gin Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      130           135           140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin
      145           150           155           160

Ser Gly Asn Ser Gin Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser
          165           170           175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180           185           190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser
          195           200           205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210           215
```

<210> 9

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 6 0
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 24 0
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 3 00
ggatacacgt atgggtattga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagacagt tgagcgcaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
ttccccccaa aaccacaagg caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccagc gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 96 0
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaaacca tctccaaaac caaagggcag 102 0
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcaactgga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatggcg agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga

```

1338

<210> 10

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Ser Tyr lie Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
          65           70           75           80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly lie Asp Tyr Trp Gly Gin Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115          120          125

```

9/66

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gin Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met lie Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gin
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr lie Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin
405 410 415

Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

10/66

His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 11
<211> 645
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 54 0
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Ala
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu He Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe He Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
145 150 155 160

11/66

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 24 0
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg 3 00
ggatactact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg 84 0
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccctccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 114 0
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccattgctga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 126 0
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga 1338

<210> 14

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

12/66

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

Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin
 405 410 415

Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 15
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ctcaattgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 24 0
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccacagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 16
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Ala
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu He
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp lie Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Gly Glu Cys
Arg 210

<210> 17

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ctggtcaagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatagca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaag	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtagta	gtagtagtta	catatactac	180
gcagactcag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acgactgtgt	attactgtgc	gagagatcga	300
ggctacctct	acggtatgga	cgtctggggc	caagggacca	cggtcacccg	ctcctcagcc	360
tccaccaagg	gcccacgcgt	cttccccctg	gcgcctgtct	ccaggagcac	ctccgagagc	420
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccgggtgac	ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg	ctctgaccag	cggegtgcac	accttcccag	ctgtcctaca	gtcctcagga	540
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	acttcggcac	ccagacctac	600
acctgcaacg	tagatcacia	gcccagcaac	accaaggtgg	acaagacagt	tgagcgcaaa	660
tggtgtgtcg	agtgcccacc	gtgcccagca	ccacctgtgg	caggaccgtc	agtcttcctc	720
ttcccccaaa	aaccceaagg	cacctcatg	atctcccggg	cccctgaggt	cacgtgcgtg	780
gtggtggacg	tgagccacga	agaccccag	gtccagtcca	actggtacgt	ggacggcgtg	840
gaggtgcata	atgccaaagc	aaagccacgg	gaggagcagt	tcaacagcac	gttcctgtgt	900
gtcagcgtcc	tcaccgttgt	gcaccaggac	tggctgaacg	gcaaggagta	caagtgcgaag	960
gtctccaaca	aaggcctccc	agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaaac	caaagggcag	1020
ccccgagaac	cacaggtgta	cacctgccc	ccatcccggg	aggagatgac	caagaaccag	1080
gtcagcctga	cctgcctggg	caaaggcttc	taccccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1140
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacacctc	ccatgctgga	ctccgacggc	1200

15/66

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gaggctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga 1338

<210> 18
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser He Ser Ser Ser Ser Ser Tyr He Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr He Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gin Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Asn Phe Gly Thr Gin Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met He Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

16/66

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gin
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr lie Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp He Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin
405 410 415

Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 19

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	ggccattaga	aatgatttag	gctgggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagcgcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagaa	ttcactctca	caatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttatta	ctgtctacag	cataatagtt	accctcggac	gttcggccaa	300
gggaccaagg	tggaaatcaa	acgaactgtg	gctgcacccat	ctgtcttcat	cttcccgccca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gtag		645

<210> 20
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Ala lie Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu lie Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg cttctggata taccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 ctggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaatagc 300
 gtgggaactg gataactacta ctacggtagt gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
 gttgagcgca aatgtttgtg cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggaggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag 780
 gtcacgtcgg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa aaaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggtgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccc ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tccatgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

19/66

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gin Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
210 215 220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met lie Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gin Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys
325 330 335

Thr lie Ser Lys Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp He Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gin Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

20/66

<210> 23
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg catagtaatg gatacaacta ttgggattgg 120
 tacctgcaga agccaggga gtctccacag gtcctgatct atttggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaaactct 300
 cccactttcg gccgaggga caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 54 0
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 24
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Asp lie Val Met Thr Gin Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser lie Ser Cys Arg Ser Ser Gin Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gin Lys Pro Gly Gin Ser
 35 40 45
 Pro Gin Val Leu lie Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys lie
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gin Ala
 85 90 95
 Leu Gin Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lie Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gin Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gin Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

21/66

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 25
<211> 1350
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
gaggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtgggta cacattctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 300
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aaggggacaat ggtcaccgctc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaa cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660
gagtccaaat atggtccccc atgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccc gacccttgag 780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
gtggatggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggtg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggtctaaccg tggacaagag caggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

<210> 26
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu lie Gin Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

22/66

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp lie Trp
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met lie Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gin Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gin Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser lie Glu Lys
325 330 335

Thr lie Ser Lys Ala Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gin Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr
355 360 365

23/66

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp He Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gin Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 27

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tttcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaacttca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg caatttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcggcggg 3 00
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu He
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala lie Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe He Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 29

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccgt 300
gggagctact tcctctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacaa gcccgcaaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 720
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccggg cccctgaggt cactgctgtg 780
gtggtggacg tgagccaaga agaccccag gttccagttca actggtacgt ggacggcgtg 84 0
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga
1338

```

```
<210> 30
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 30

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

26/66

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr lie Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin
405 410 415

Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 31
<211> 645
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
gacatgcaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

27/66

<400> 32

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

<210> 33

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ctggtcaagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatagca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggaagg	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtagta	gtagtagtta	catatactac	180
gcagactcag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatcgt	300
ggatacagct	atggtcttga	ctactggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctcctcagcc	360
tccaccaagg	gcccatcggt	cttccccctg	gcgcctgtct	ccaggagcac	ctccgagagc	420

```

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc 720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 84 0
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aagcctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgccttgt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 114 0
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga 1338

```

<210> 34

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Tyr lie Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gin Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

29/66

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

<210> 35
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg cgacttatta ctgtctacag cttaatagtt acccattcac ttccggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

```

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5                      10                      15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Asp
          20                      25                      30

Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
          35                      40                      45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50                      55                      60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
          65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin Leu Asn Ser Tyr Pro Phe
          85                      90                      95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp He Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100                      105                      110

Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
          115                      120                      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130                      135                      140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
          145                      150                      155                      160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165                      170                      175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180                      185                      190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195                      200                      205

```

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37
<211> 1350
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
gaggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagacttcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 24 0
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 3 00
aggtataact ggaactacgg ggctttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag 54 0
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccacac tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccc gacccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccc aggtccagtt caactggtac 840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccccg cgacatcgcc 1140
gtgagtgagg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

<210> 38
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu lie Gin Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu	Gin	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85						90						95	
Ala	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Asn	Trp	Asn	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	lie	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gin	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
		115				120						125					
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr		
		130					135					140					
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145					150					155		160					
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
			165					170					175				
Ala	Val	Leu	Gin	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
			180					185					190				
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp		
		195					200					205					
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr		
210					215					220							
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro		
225					230					235		240					
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	lie	Ser		
			245					250					255				
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gin	Glu	Asp		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Gin	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gin	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
290					295					300							
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gin	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315		320					
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	lie	Glu	Lys		
			325					330					335				
Thr	lie	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gin	Pro	Arg	Glu	Pro	Gin	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Gin	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gin	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	lie	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
370					375					380							

Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gin Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 39

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 6 0
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agcaatttag cctgggtcca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaacttca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 54 0
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

```

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Arg Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu He
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly He Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe He Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41

<211> 1350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacattctac 180
gcagactccg tgacggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgttt 240
ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atcactgtgc gaaagatgga 3 00
aggtttaact ggaactacgg ggcttctgat atctggggcc aagggaccat ggtcaccgtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttccccgc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt 66 0
gagtcctaat atgggtcccc atgcccata tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac 84 0
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa g acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 96 0
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaaa catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct cctgtctctt gggtaaata 1350

```

<210> 42

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala He Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr He Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gin Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Ser Asp He Trp
 100 105 110

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met He Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gin Glu Asp
 260 265 270

36/66

Pro Glu Val Gin Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser lie Glu Lys
 325 330 335

Thr lie Ser Lys Ala Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gin Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gin Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

Lys

<210> 43
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43

gaaatagtga	tgacgcagtc	tccagccact	ctgtctgtgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	ggaccagtca	gagtgttagc	agcaacttag	cctgggtacca	gcagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatggt	gcatccacca	ggccactcgg	tatcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtggtgc	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagtct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	tataataact	ggccgctcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	acgaactgtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gtag		645

```
<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 44
Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1           5                               10                      15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
          20                25              30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu lie
      35                     40                   45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly lie Pro Ala Arg Phe Ser Gly
   50                        55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Ser
  65                          70                    75                                80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
          85                             90                              95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lie Lys Arg Thr Val Ala Ala
        100                 105               110

Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
    115                         120                       125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
   130                135              140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
  145                     150                   155                           160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165                170              175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180                185              190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
     195                     200                   205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

```
<210> 45
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 45
Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

38/66

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Ser Tyr lie Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gin Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

<211> 358

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 6 0
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 24 0
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 3 00
gggtacagct atggtcttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Ala
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gin Arg Leu lie
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80

39/66

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu lie Lys
100 105

<210> 48
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgctttag gctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctcagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 49
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Gin Val Gin Leu Val Gin Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Gin Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp lie Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gin Lys Phe
50 55 60
Gin Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser lie Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Thr Val Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 370
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 50

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atcactgtgc gagaaatag 3 00
gtgggaagtg ggtactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctctcag 370

```

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

Asp lie Val Met Thr Gin Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1           5                      10                      15

Glu Pro Ala Ser lie Ser Cys Arg Ser Ser Gin Ser Leu Leu His Ser
          20                      25                      30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gin Lys Ser Gly Gin Ser
          35                      40                      45

Pro Gin Leu Leu lie His Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50                      55                      60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys lie
          65                      70                      75                      80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gin Val
          85                      90                      95

Leu Gin Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lie Lys
          100                     105                     110

```

<210> 52

<211> 337

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gaggctcctg catagtaatg gatacaacta ttggattgg 120
tacctgcaga agtcagggca gtctccacag ctctgatcc atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 24 0
agcagagtgg aggtgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagttct acaaactccg 3 00
ctcactttcg gcggaggggac caaggtggag atcaaac 337

```

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

<210> 54

<211> 358

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 300
 ggatacagct atggtattga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

42/66

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu He Lys
100 105

<210> 56
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgctttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 3 00
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 57
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser He Ser Ser Ser Ser Tyr He Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr He Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gin Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115

<210> 58
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg 3 00
 ggatactact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctcag 358

<210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Ala
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp lie Lys
 100 105

<210> 60
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 gacatccaga tgaccagtc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ctcaacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct 24 0
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac ttctggccct 300
 gggaccaag tggatatcaa ac 322

<210> 61
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Ser Tyr lie Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ser Tyr Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gin Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccgt 3 00
 gggagctact tcctctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Asp Met Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Asp
 20 25 30

45/66

Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys
100 105

<210> 64

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

gacatgcaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Ser Tyr He Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr He Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gin Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 358
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acgactgtgt attactgtgc gagagatcga 300
ggctacctct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcacctg ctctcag 358

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr He Thr Cys Arg Ala Ser Gin Ala He Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu He
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu He Lys
100 105

<210> 68
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

```
<210> 69
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 69
Gin Val Gin Leu Val Gin Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1           5                               10                15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
          20                               25                30

Tyr Met His Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Gin Gly Leu Glu Trp Met
      35                               40                45

Gly Trp lie Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gin Lys Phe
  50                               55                60

Gin Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser lie Ser Thr Ala Tyr
  65                               70                75                80

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85                               90                95

Ala Arg Asn Thr Val Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
      100                               105                110

Trp Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                               120

```

```
<210> 70
<211> 370
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 70
cagggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctggggcctc  agtgaaggtc  60
tcttgcaagg  cttctgggata  tactttcacc  ggctactata  tgcaactggg  ggcacaggcc  120
cctggacaag  ggcttgagtg  gatgggatgg  atcaacccta  acagtgggtg  cacaactat  180
gcacagaagt  ttcaggggcag  ggtcaccatg  accagggaca  cgtccatcag  cacagcctac  24 0
ctggagctga  gcaggctgag  atctgacgac  acggccgtgt  attactgtgc  gagaaatcag  3 00
gtgggaactg  gatactacta  ctacggtatg  gacgtctggg  gccaaaggac  cacggtcacc  360
gtctctcag                                     370

```

```
<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 71
Asp He Val Met Thr Gin Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

<210> 72
 <211> 337
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagta gagcctcctg catagtaatg gatacaacta ttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag gtcctgatct atttggtttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 3 00
 ccactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaac 337

<210> 73
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser lie Ser Ser Ser Ser Tyr lie Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

49/66

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gin Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 358
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 74
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggc cctgagactc 6 0
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 3 00
ggatacagct atgggtcttga ctactggggc caggaacccc tggtcaccgt ctccctcag 358

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Gin Gly lie Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu lie
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gin Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gin Leu Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp lie Lys
100 105

<210> 76
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 76
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

agggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg cgacttatta ctgtctacag cttaatagtt acccattcac tttcgccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 77
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu lie Gin Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp lie Trp
 100 105 110
 Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78
 <211> 367
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 gaggtgcagc tattggagtc tgggggagggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctttgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtgggta cacattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 3 00
 aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacccgtc 360
 tcttcag 367

<210> 79
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu lie
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala lie Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lie Lys
 100 105

<210> 80

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120
 ggccaggtc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tttcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
 gaagattttg caatttatta ctgtcagcag tataataact ggccggtcac tttcggcggg 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 81

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu lie Gin Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

52/66

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp lie Trp
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

gaggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagacttcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 3 00
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
tccttcag 367

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Arg Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu lie
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly lie Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys
100 105

<210> 84

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttaga agcaatttag cctgggtcca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa ac 322

```

<210> 85

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

```

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
  1         5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20              25              30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35              40              45

```

```

Ser Ala lie Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
  50              55              60

```

```

Thr Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
  65              70              75              80

```

```

Leu Gin Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
          85              90              95

```

```

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Ser Asp He Trp
          100              105              110

```

```

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

<210> 86

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

```

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacattctac 180
gcagactccg tgacgggccc gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaattga acagcctgag agccaggagc acggccgtat atcactgtgc gaaagatgga 300
aggtttaact ggaactacgg ggcttctgat atctggggcc aagggacat ggtcaccgct 360
tcttcag 367

```

<210> 87
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87
 Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu lie
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly lie Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys
 100 105

<210> 88
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccact ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 6 0
 ctctcctgca ggaccagtca gagtgttagc agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 89
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp lie
 20 25 30
 lie Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
 35 40 45

55/66

Phe Val Phe Leu Gin Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gin Ala
50 55 60

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65 70 75 80

Pro He Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gin lie lie Tyr Gly
85 90 95

Lys He Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100 105

<210> 90

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15

Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp He
20 25 30

He Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gin Cys Glu
35 40 45

Tyr Met Phe Met Gin Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gin Gin Ala
50 55 60

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65 70 75 80

Pro He Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gin Gin He He Tyr Gly
85 90 95

Lys He Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100 105

<210> 91

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<220>

<221> veranderde base

<222> (21)

<223> Inosine

<400> 91

caggtgcagc tggagcagtc ngg

<210> 92
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificiële Sequentie

<220>
<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 92
gctgaggag tagagtcctg agga

24

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificiële Sequentie

<220>
<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 93
tacgtgccaa gcatcctcgc

20

<210> 94
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificiële Sequentie

<220>
<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 94
aggctggaac tgaggagcag gtg

23

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificiële Sequentie

<220>
<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 95
ccctgagagc atcaymyarm aacc

24

<210> 96
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 96

hvthtccact yggatgacrg cactg

25

<210> 97

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 97

attyrgtgat cagsactgaa casag

25

<210> 98

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 98

gsartcagwc ycwvycagga cacagc

26

<210> 99

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 99

caccaggkga tttgcatatt rtccc

25

<210> 100

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetische primer

<400> 100

atcaatgcct gkgtcagagc yytg

24

<210> 101
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch oligonucleotide

<400> 101
 agccagaca

<210> 102
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificiële sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch oligonucleotide

<400> 102
 gtctagac

<210> 103
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

<400> 103
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

<400> 104
 Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp lie lie Ala
 1 5 10 15

Pro Lys

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 105

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

Gin Lys

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 106

Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gin	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	

Gly Pro

<210> 107

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 107

Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	He	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn
1				5					10					15	

Gly Lys

<210> 108
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>
 <223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

<400> 108
 Glu Gin lie lie Tyr Gly Lys lie Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys
 1 5 10 15

Gly Cys Ser

<210> 109
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>
 <223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

<400> 109
 His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
 1 5 10 15

Glu Ala

<210> 110
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>
 <223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

<400> 110
 Phe Gly Trp Asp Trp lie lie Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr
 1 5 10 15

Cys Ser

<210> 111
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 111

Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gin Lys Tyr Pro His Thr His Leu
1 5 10 15

Val His

<210> 112

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 112

Gin Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys
1 5 10 15

Met Ser

<210> 113

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
Synthetisch peptide

<400> 113

Pro lie Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gin lie lie Tyr Gly
1 5 10 15

Lys lie

<210> 114

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 114

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtgggta cacattctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 3 00
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360

```

tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcggtga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgta gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 660
gagcgcaaat gttgtgtoga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 720
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg 84 0
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgcaggg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaaacc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttctt accccagcga catcgccgtg 114 0
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1200
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1347

```

<210> 115

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp lie Trp
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

63/66

Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gin Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met lie Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gin Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gin Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Val His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr
325 330 335

lie Ser Lys Thr Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp He Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gin Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 116
<211> 645
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 116

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccaa ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tgggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 54 0
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 6 00
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagaggt gtttag 645

```

<210> 117

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu He
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly He Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe He Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118
Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr lie Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr He Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp lie Trp
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 367
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 119
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtggtta cacattctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 3 00
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
tcctcag 367

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Glu lie Val Met Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gin Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Arg Leu Leu lie
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly lie Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gin Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu He Lys
 100 105

<210> 121

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 121

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 6 0
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificiële Sequentie

<220>

<223> Beschrijving van Artificiële Sequentie:
 Synthetisch peptide

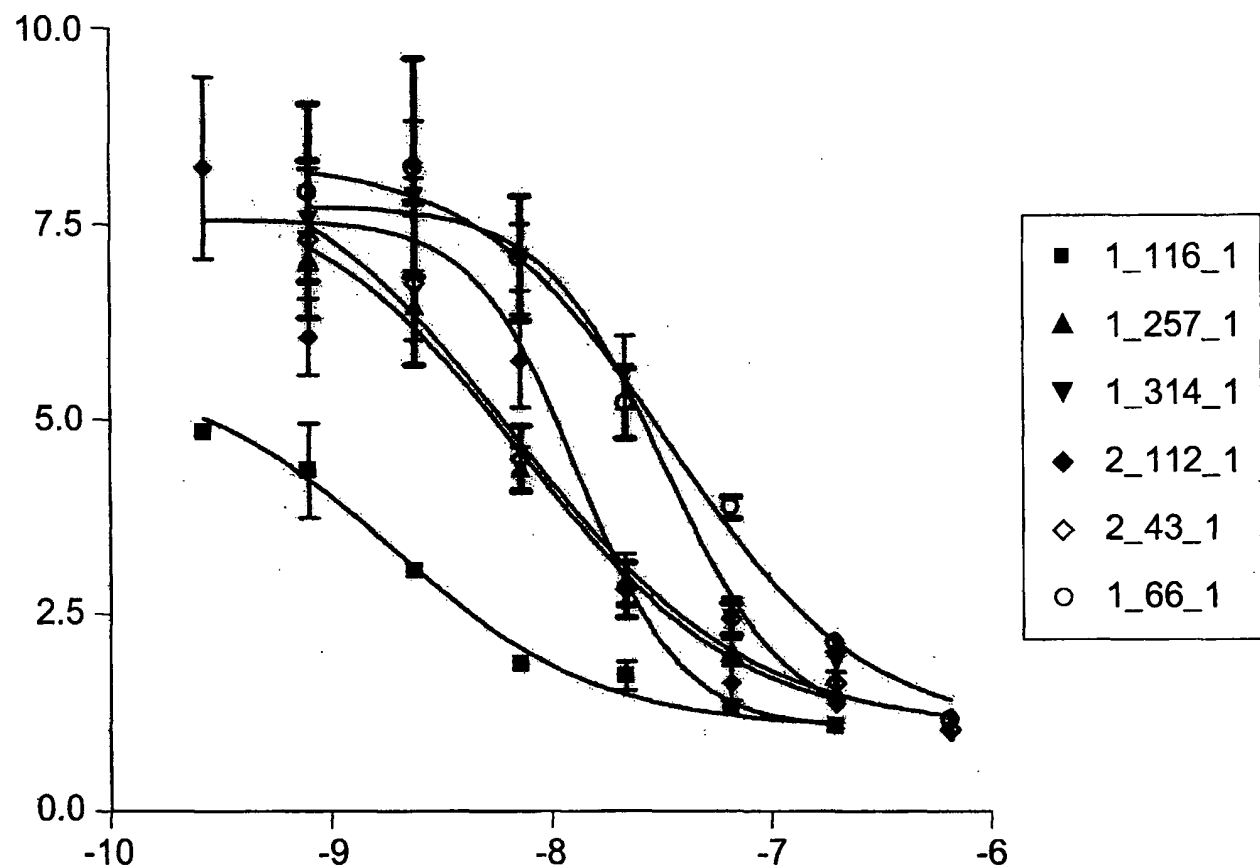
<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

1031674

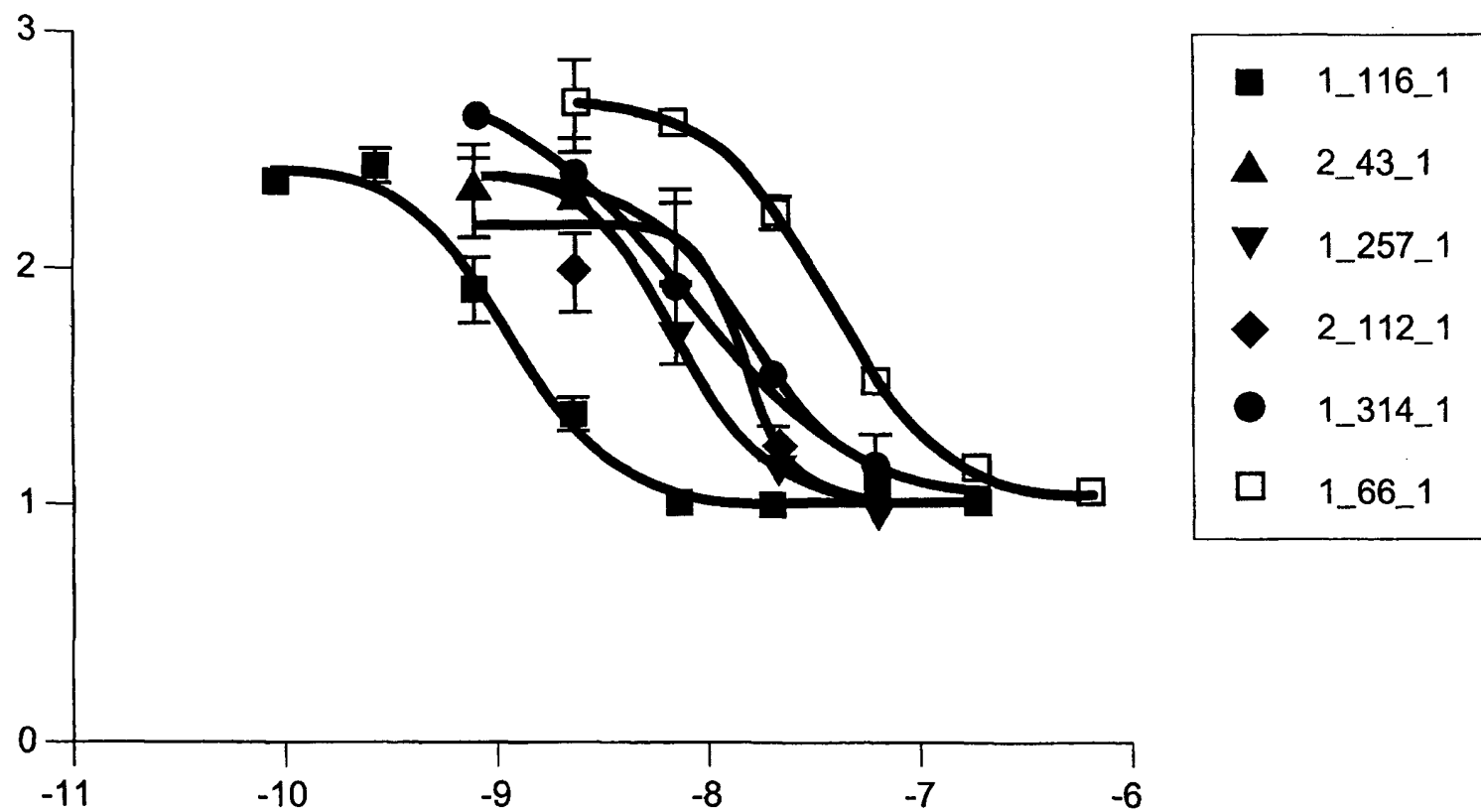
1031674

FIG. 1



	1_116_1	1_257_1	1_314_1	2_112_1	2_43_1	1_66_1
EC50	1.908e-009	7.522e-009	3.353e-008	1.354e-008	6.857e-009	3.513e-008

FIG. 2



	1_116_1	2_43_1	1_257_1	2_112_1	1_314_1	1_66_1
EC50	1.216e-009	1.689e-008	7.509e-009	1.604e-008	8.025e-009	3.994e-008

FIG. 3

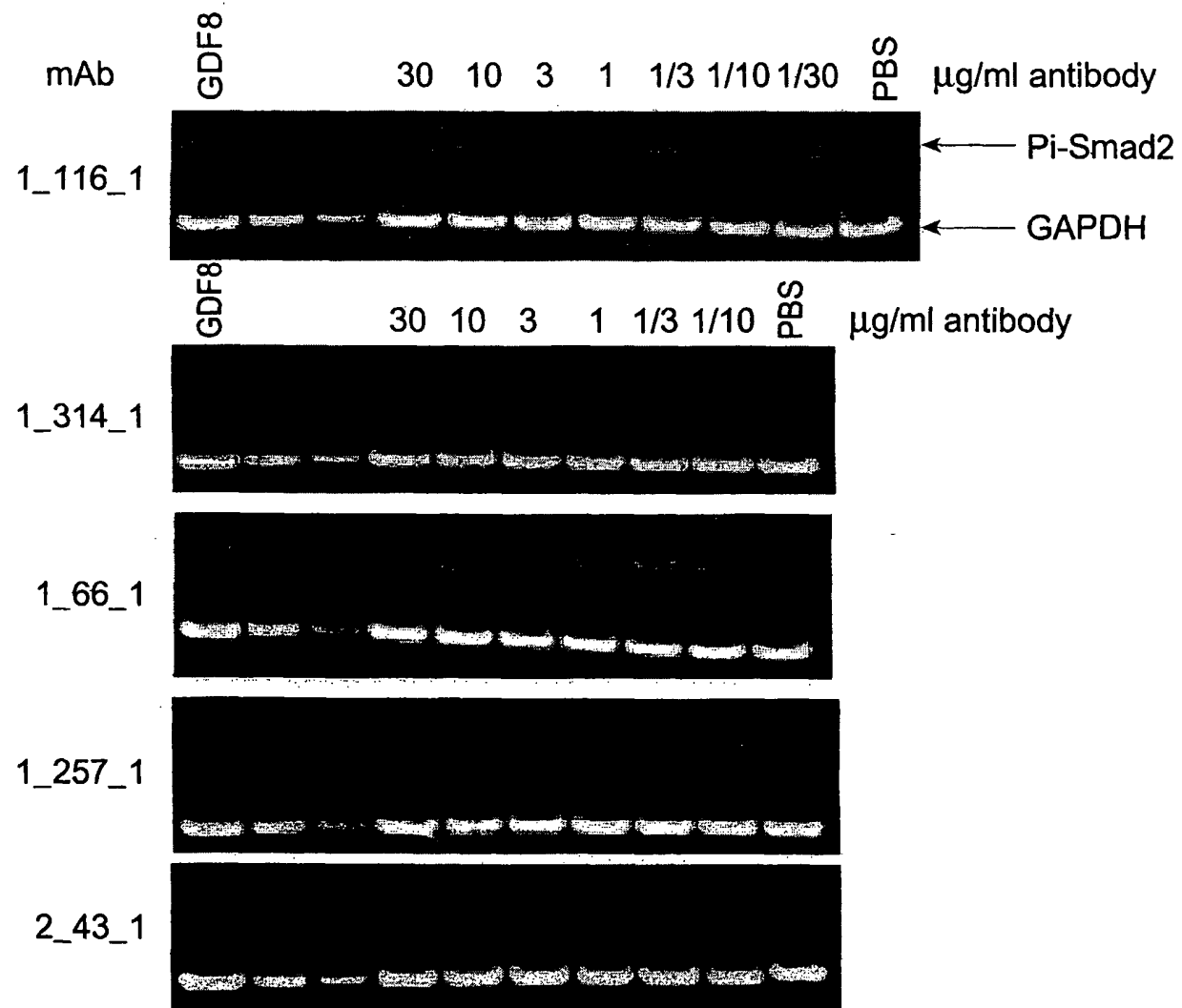


FIG. 4A

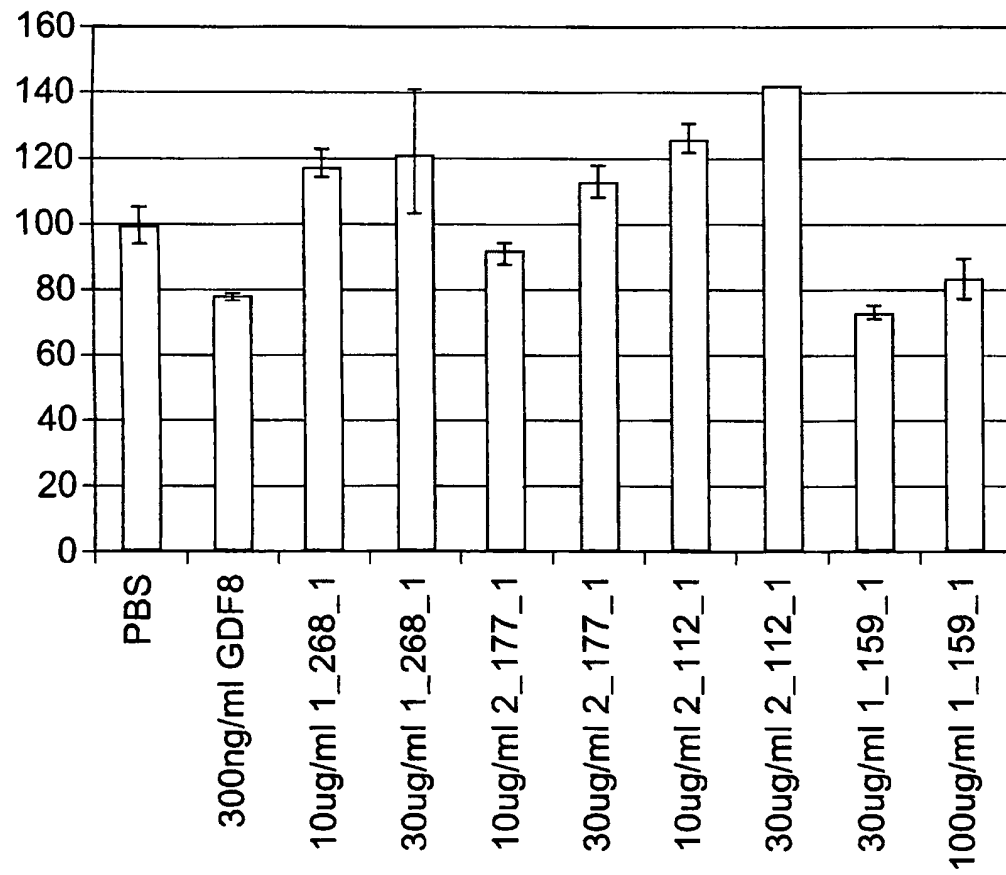


FIG. 4B

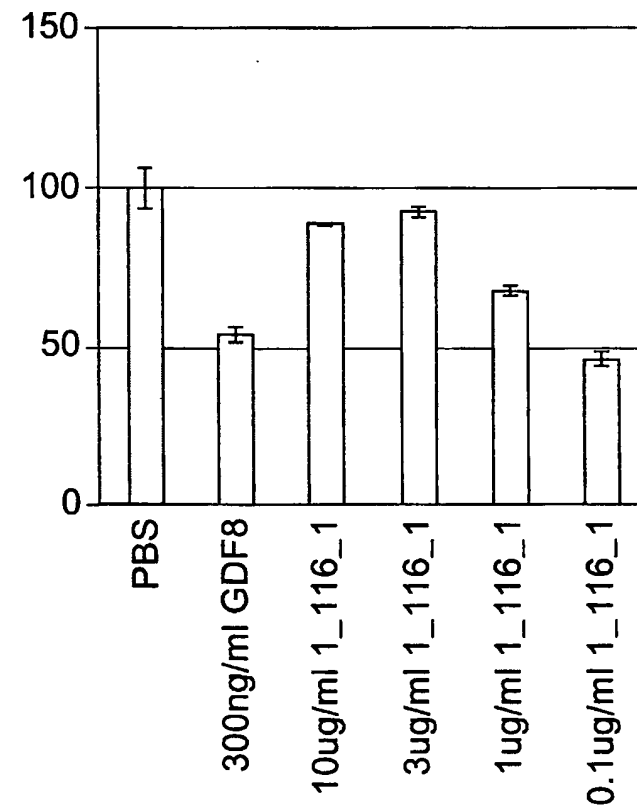
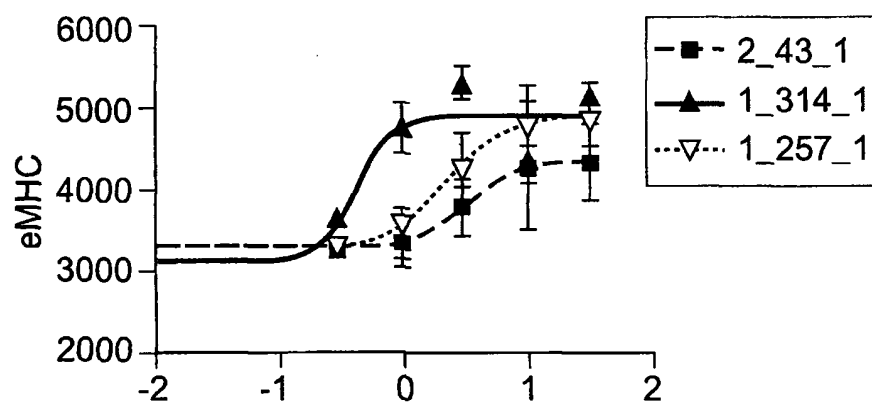
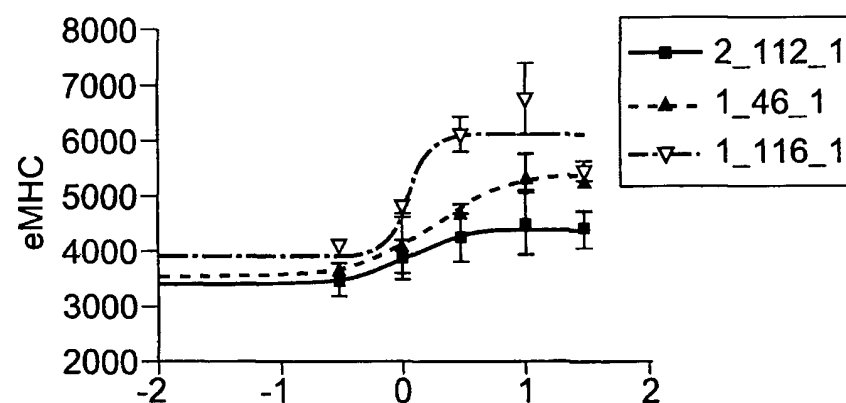


FIG. 5A



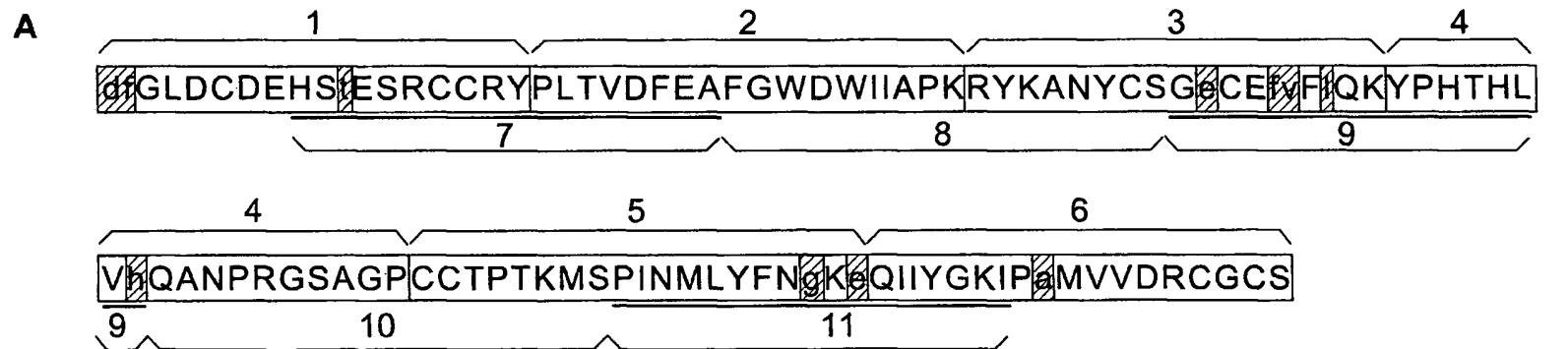
	2_43_1	1_314_1	1_257_1
EC50	3.321	0.4099	2.145

FIG. 5B



	2_112_1	1_46_1	1_116_1
EC50	1.166	1.869	1.122

FIG. 6



B

1_116_1	2
1_132_1	
1_46_1	
1_257_1	2
2_112_1	1,5
2_43_1	1,5
1_136_3	2
1_314_1	
1_66_1	
2_177_1	1,5

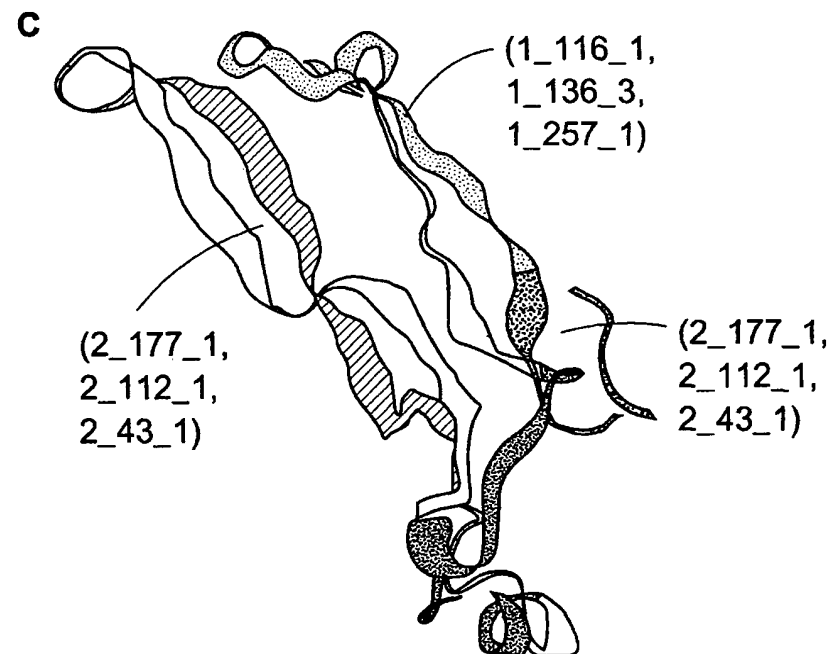


FIG. 7

1	DFGLDCDEHSTESRCCRY	103
2	PLTVDFEAFGWDWIIAPK	104
3	RYKANYCSGECEFVFLQK	105
4	YPHTHLVHQANPRGSAGP	106
5	CCTPTKMSPINMLYFNGK	107
6	EQIIYGKIPAMVVDRCGCS	108
7	HSTESRCCRYPLTVDFEA	109
8	FGWDWIIAPKRYKANYCS	110
9	GECEFVFLQKYPHTHLVH	111
10	QANPRGSAGPCCTPTKMS	112
11	PINMLYFNGKEQIIYGKI	113

FIG. 8

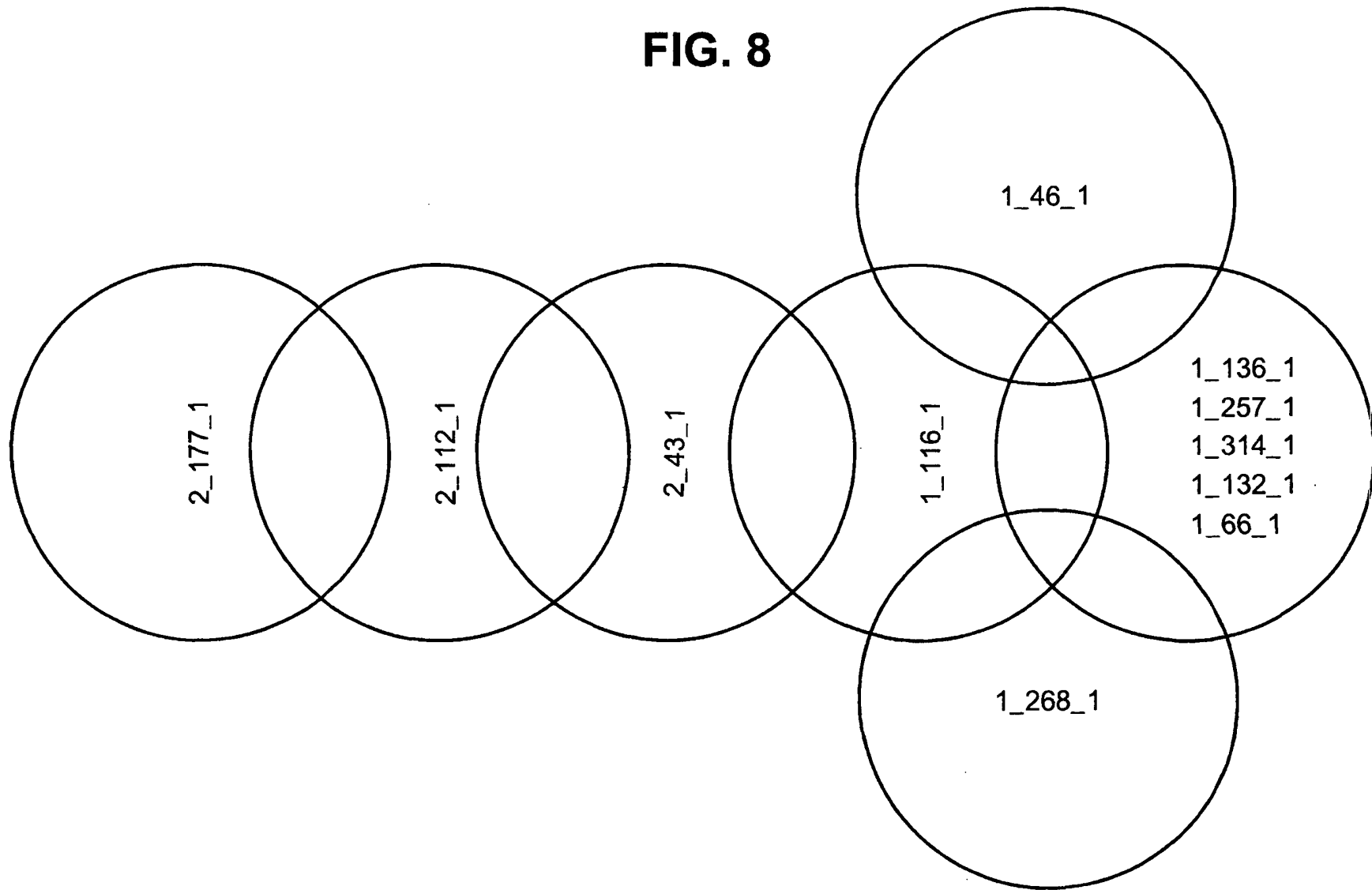


FIG. 9

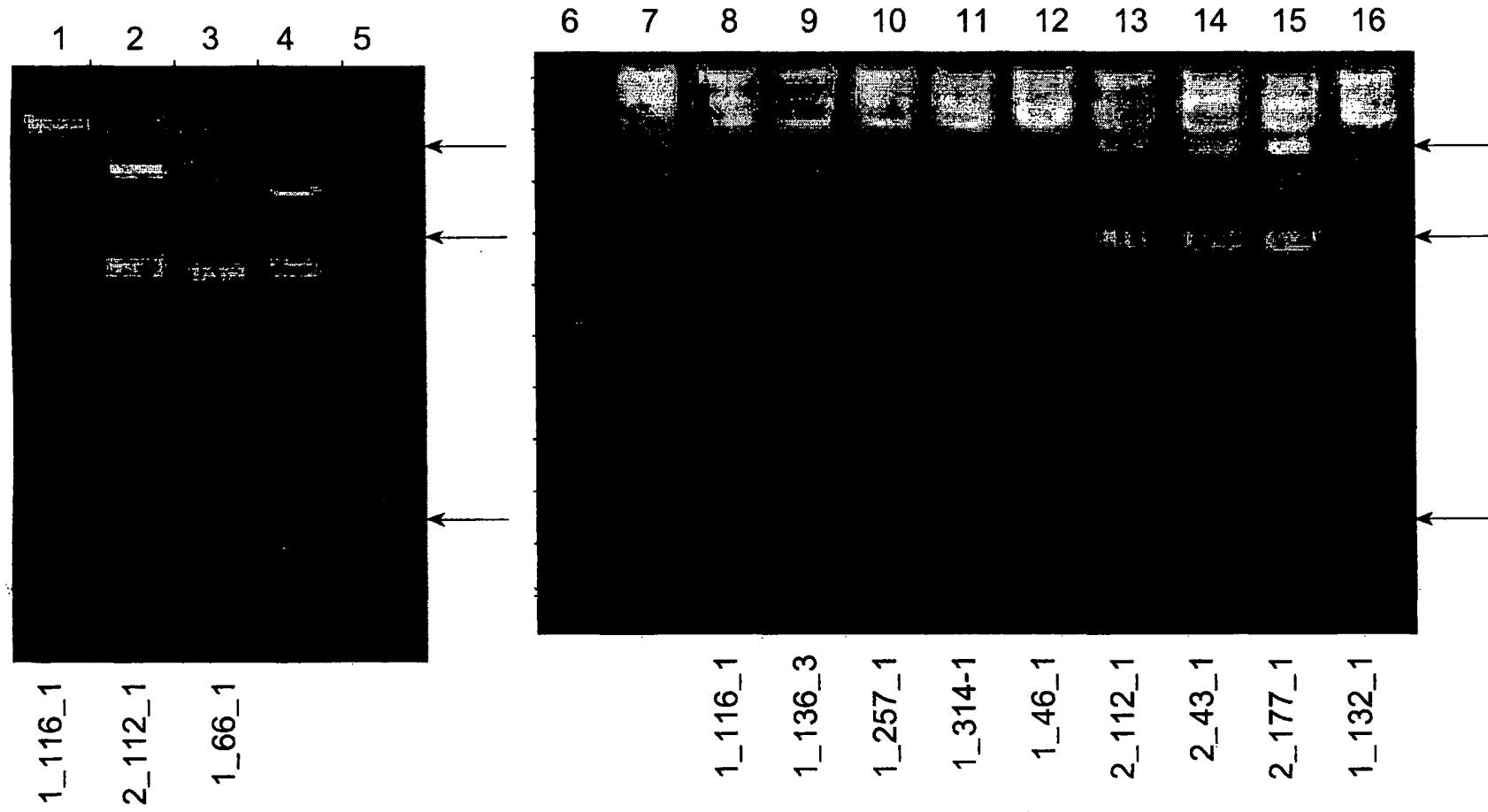


FIG. 10



1_116_1

2_112_1

1_66_1

2_43_1

2_177_1

FIG. 11

GDF-8 DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHL 60
GDF-11 NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTHL 60
.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.

GDF-8 VHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS 109 SEQ ID NO:89
GDF-11 VQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS 109 SEQ ID NO:90
*:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.:*****.

FIG. 12

	A204 IC50 (nM)	L6 IC50 (nM)	<u>BIAcore</u> <u>KD (pM)</u>		<u>VH</u>	<u>D</u>	<u>JH</u>	<u>VK</u>	<u>JK</u>
1_116_1	0.83	1.3	12	60% 2uM, IC50>=0.7uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK1
1_132_1	1.8	1.7		IC50=2.8nM	1-02	4-23	JH6B	A3	JK4
1_46_1	3.1	8.3	99	IC50=7nM	1-02	4-23	JH6B	A3	JK4
1_257_1	9.3	7.7	160.0	50% 4uM IC50~4uM	3-21	5-12	JH6B	A30	JK3
2_112_1	12.3	11.4	11	30% 1.3uM IC50>1.3uM	3-23	1-7	JH3B	L2	JK4
2_43_1	13.9	16.9	1500	0.7uM	3-23	1-7	JH3B	L2	JK4
1_136_3	14	6.6	43.0	0.2uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK1
1_268_1	19	37	240		3-21	1-26	JH4B	A30	JK4
1_314_1	28.5	9.6	110.0		3.21		JH6B	A30	JK1
1_66_1	35.1	41.9	83	40% 2uM IC50~2uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK3
2_177_1	40	223	890		3-23	1-7	JH3B	L2	JK4

[illegible]

FIG. 14

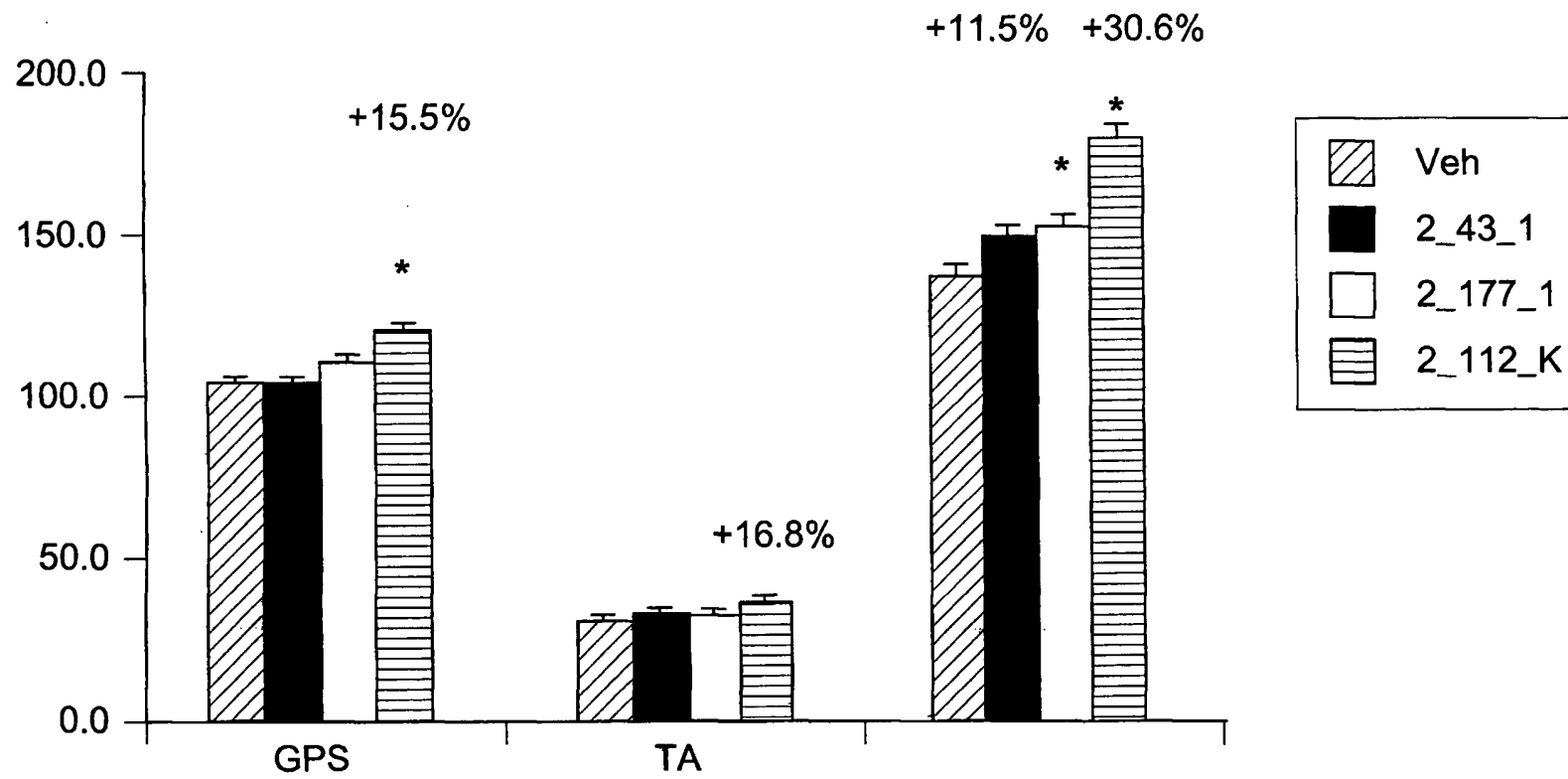
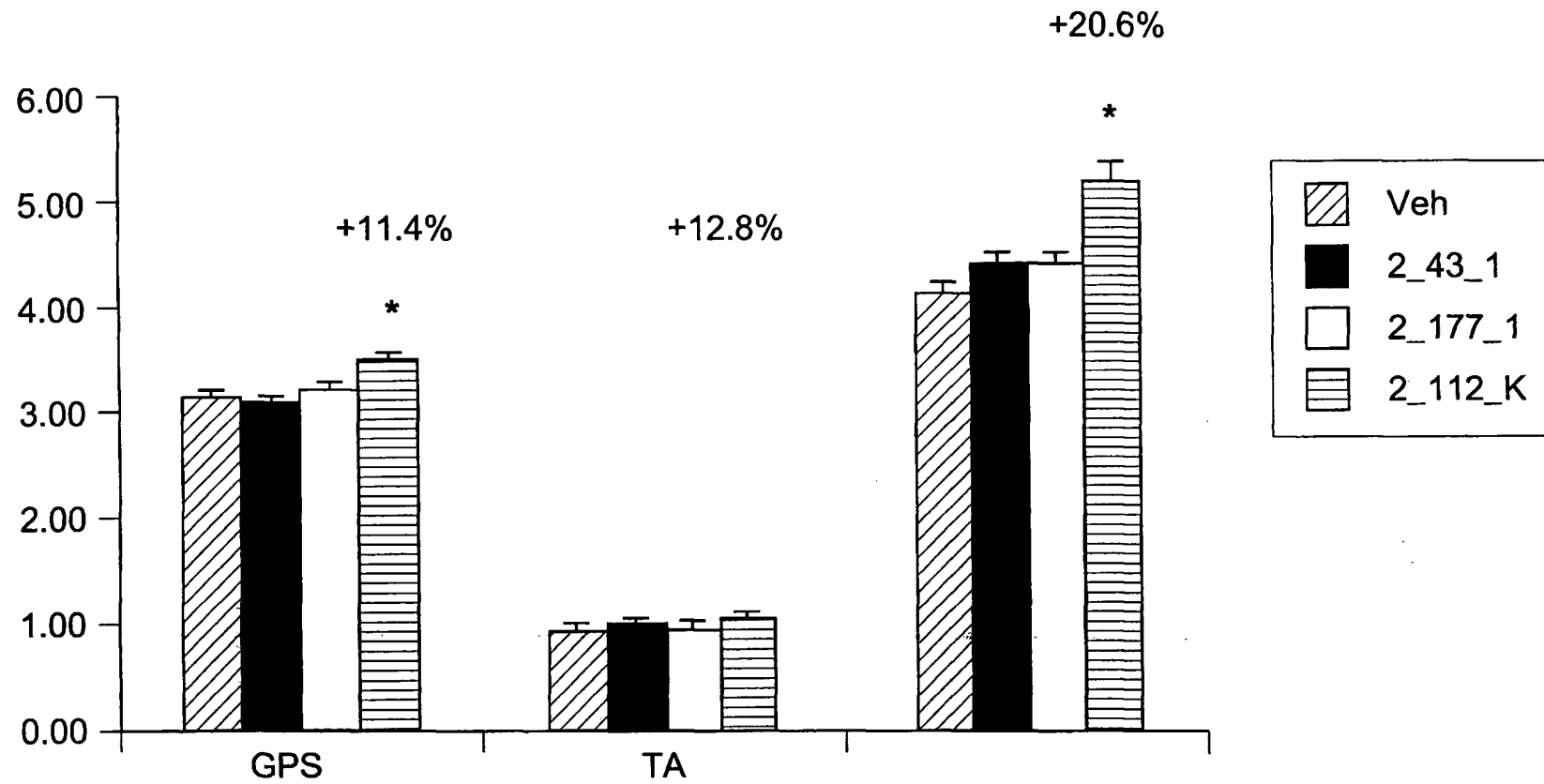


FIG. 15



* $p < 0.05$

FIG. 16A

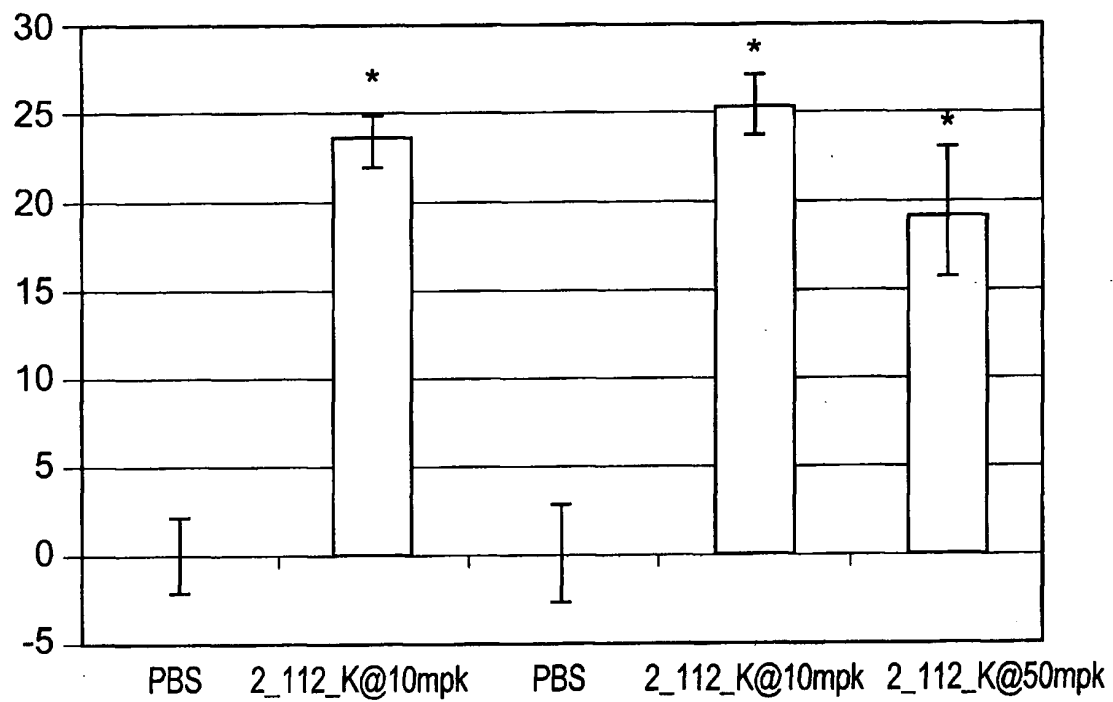


FIG. 16B

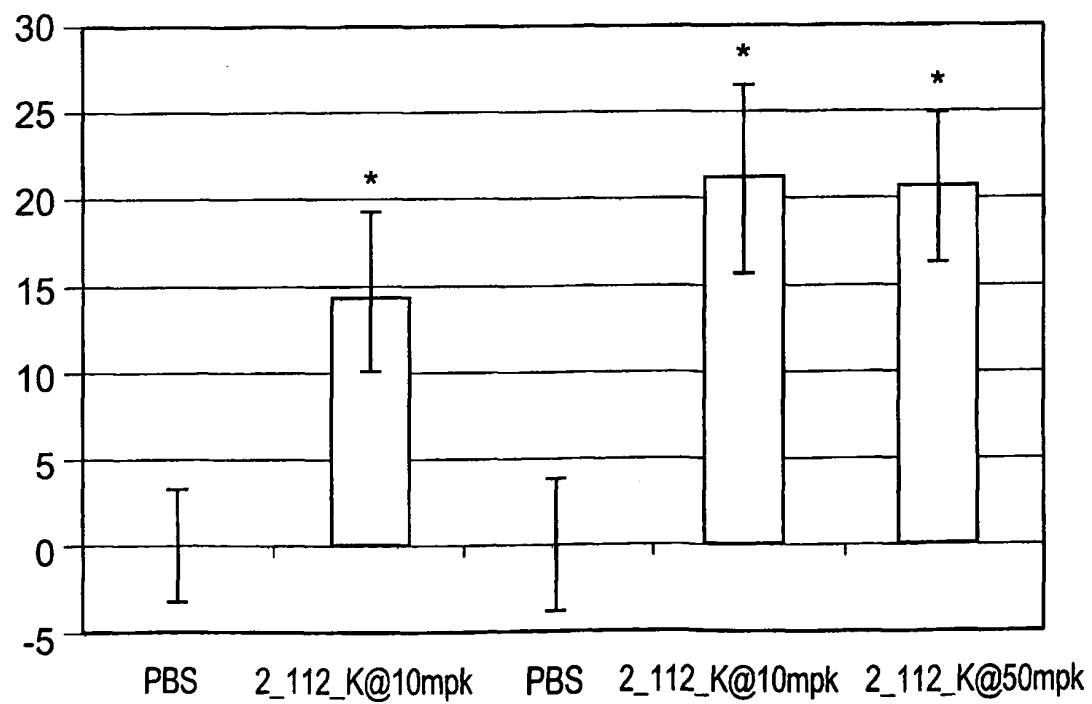


FIG. 17A

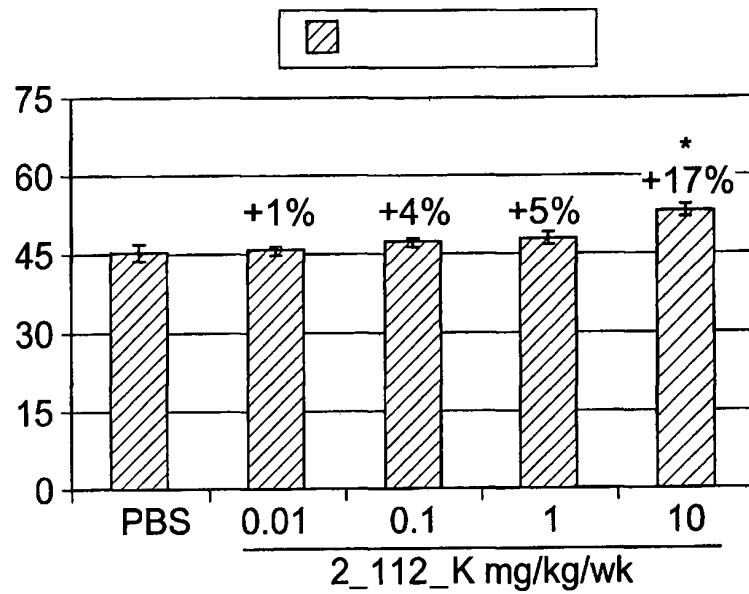


FIG. 17B

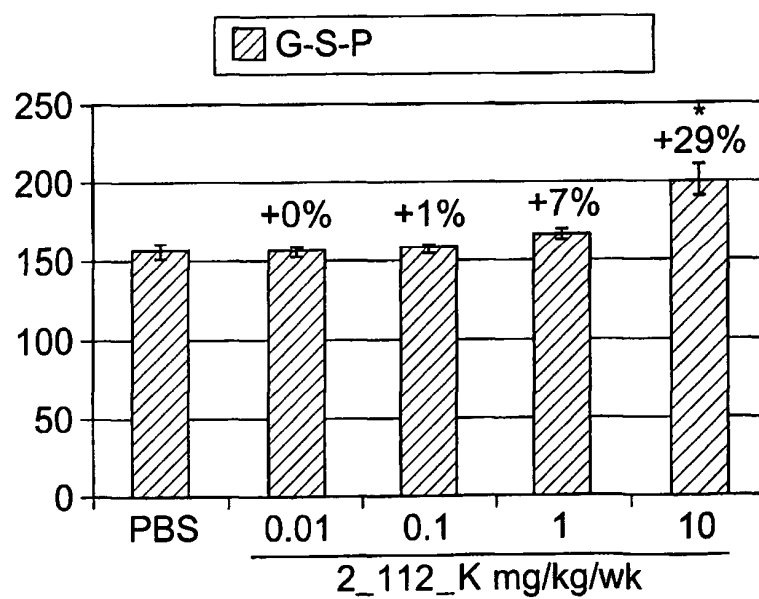


FIG. 17C

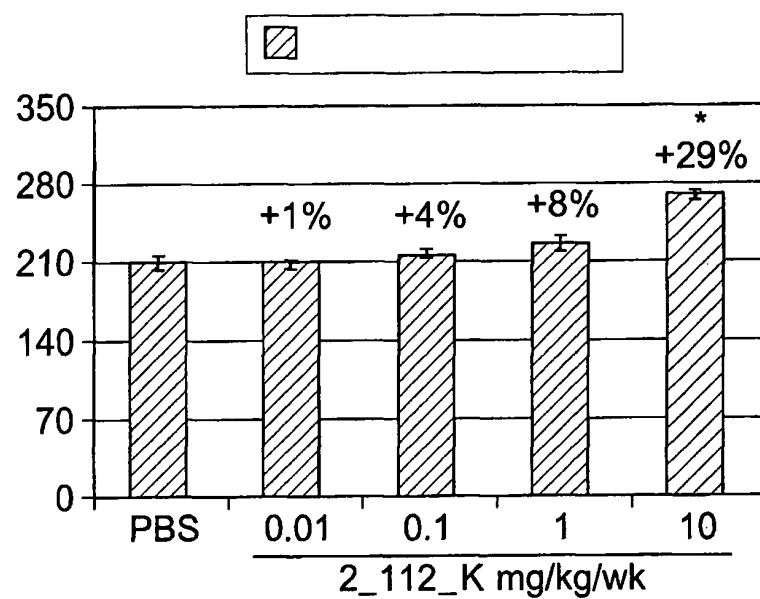


FIG. 17D

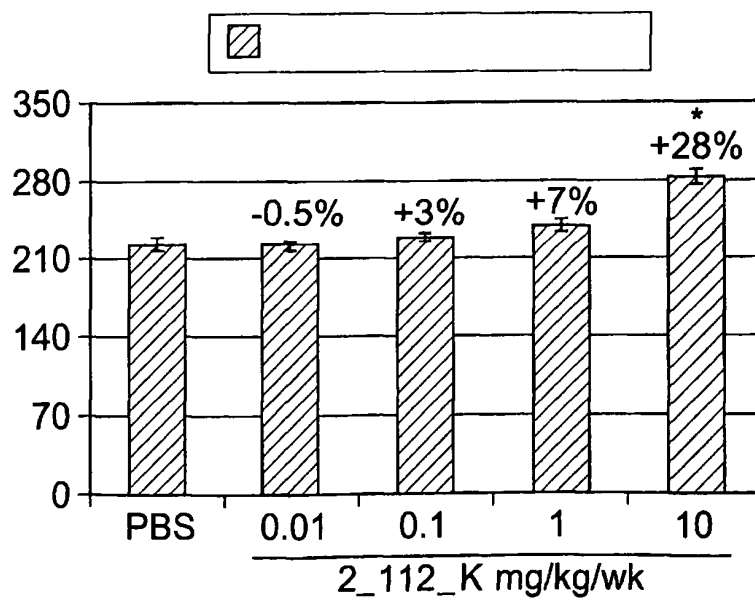


FIG. 18A

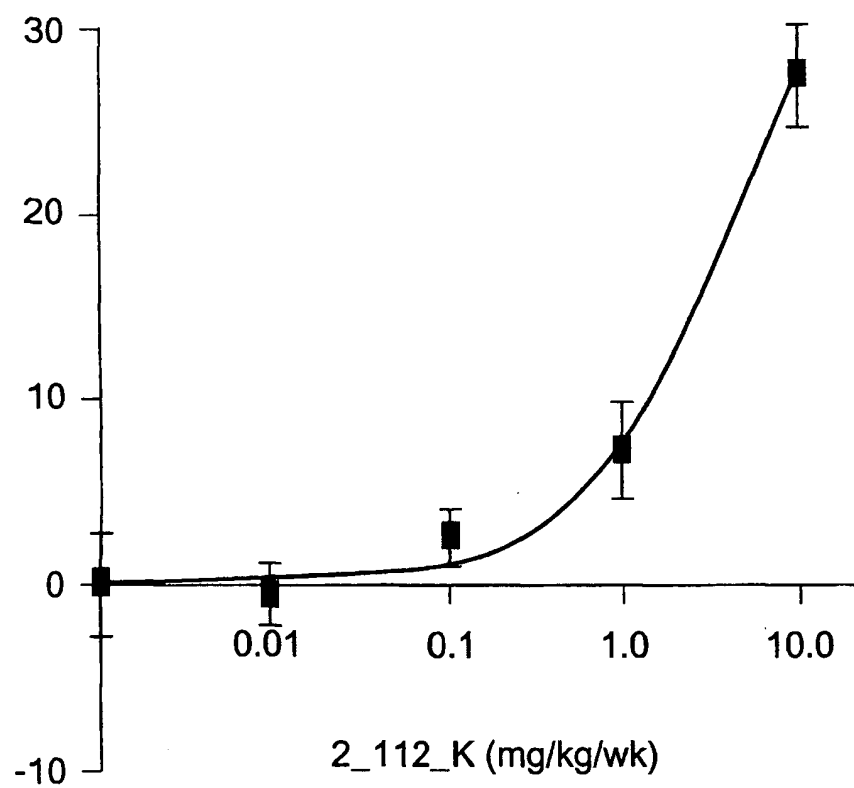


FIG. 18B

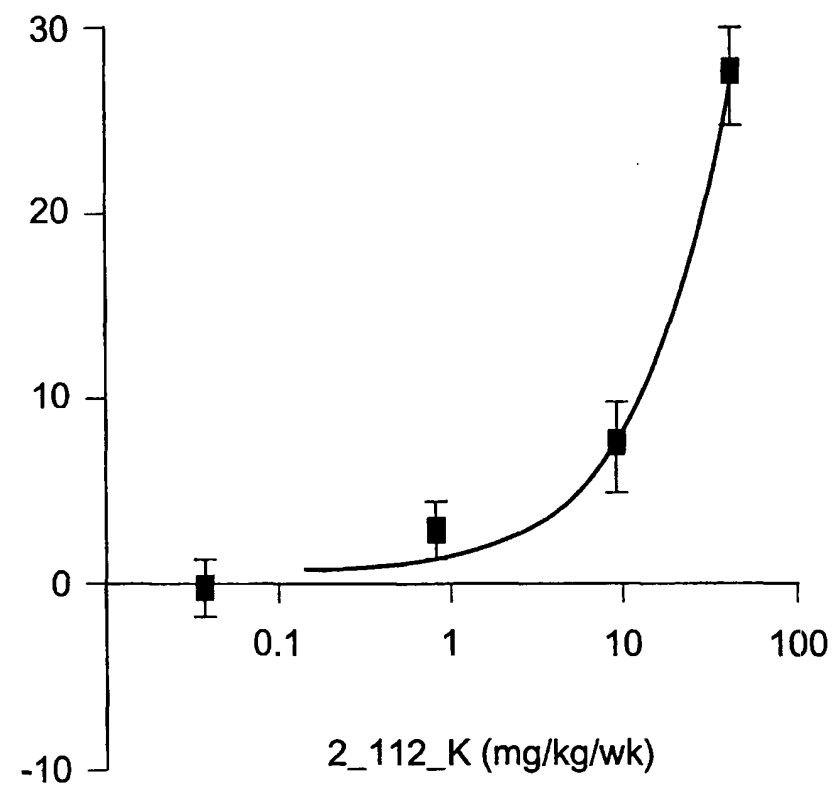


FIG. 19A

EVQLLES GGG LIQ PGG SLRLSCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGYTFY 60
EVQLLES GGG LVQ PGG SLRLSCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGYTFY 60
*****:*****

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGRYNWNYGAFDIWGQGMVTV 120
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGRYNWNYGAFDIWGQGMVTV 120

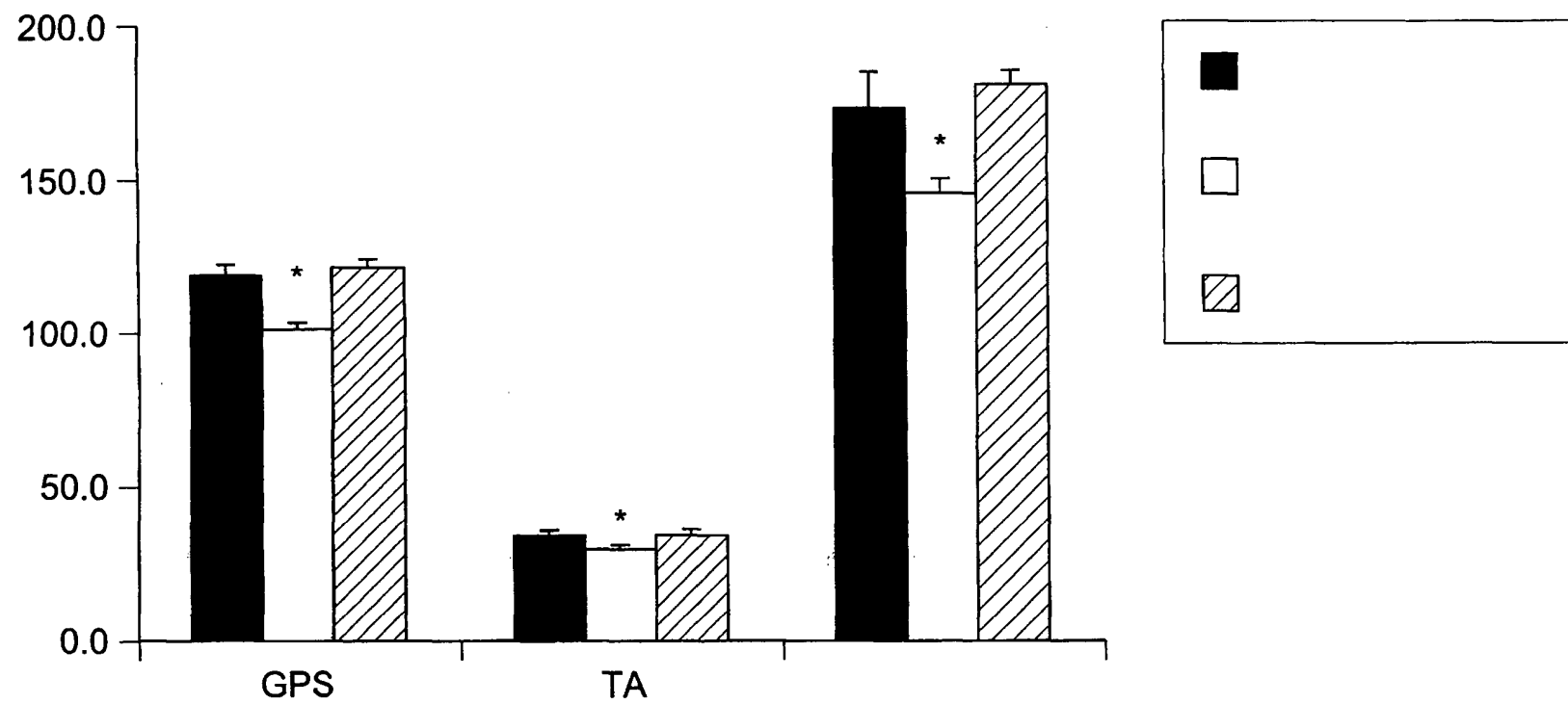
SS 122
SS 122
**

FIG. 19B

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGFPA 60
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA 60
*****: **

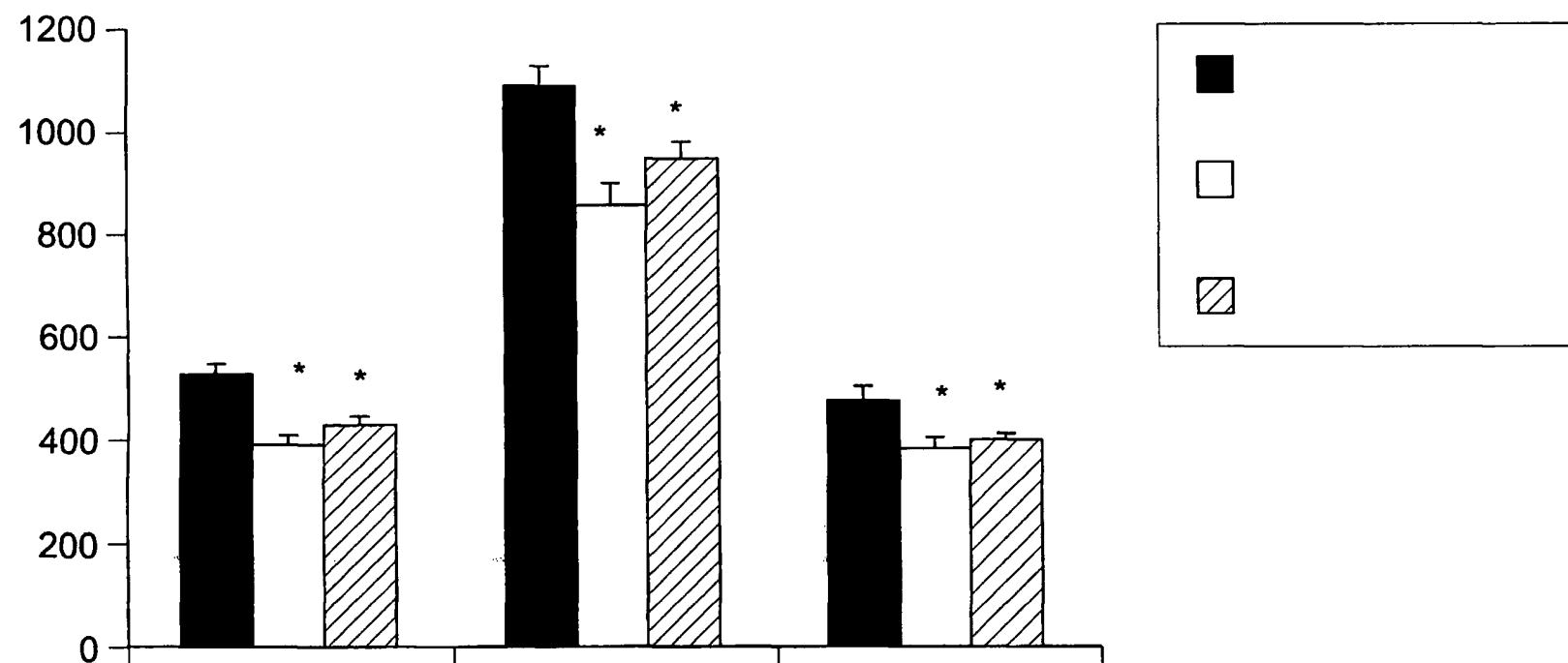
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAIYYCQQYNNWPLTFGGGTKVEIK 107
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGGGTKVEIK 107
*****:*****

FIG. 20A



* $p < 0.05$ vs. Veh/

FIG. 20B



* p < 0.05 vs. Veh/

1031674



RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octroolaanvraag Nr.:

NO 135751
NL 1031674

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
	EENHEID VAN UITVINDING ONTBREEKT zie aanvullingsblad B ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C -----		INV. C07K16/22 A61K39/395 C12N15/13 C12N5/12 A61P3/08 A61P3/04 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00
X	WO 2004/037861 A2 (WYETH CORP [US]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; VELDMAN GEERTRUIDA M [U] 6 mei 2004 (2004-05-06) * bladzijde 1, alinea 2 * * bladzijde 4, alinea 13 - bladzijde 6, alinea 18 * * bladzijde 16, alinea 52 - bladzijde 17, alinea 55 * * tabellen 1,2 * * bladzijde 22, alinea 60 - bladzijde 23, alinea 62 * * bladzijde 29, alinea 79 - bladzijde 31, alinea 84 * * bladzijde 33, alinea 90 - bladzijde 36, alinea 95 * * bladzijde 39, alinea 102 * * conclusies 1-51; voorbeelden 4-14 * -----	1,14-20, 22	
X	US 2003/138422 A1 (AGHAJANIAN JANE [US] ET AL) 24 juli 2003 (2003-07-24) * bladzijde 1, alinea 2 * * bladzijde 2, alinea 10,12-15 * * bladzijde 6, alinea 62 - bladzijde 8, alinea 82 * * conclusies 1-54; voorbeelden 3-13 * -----	1,14-20, 22	Onderzochte gebieden van de techniek C07K
A	WO 2004/108157 A2 (WYETH CORP [US]; WHITTEMORE LISE-ANNE [US]; LI XIANGPING [US]) 16 december 2004 (2004-12-16) * het gehele document * -----	1,18	
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek		Datum waarop het onderzoek werd voltooid	Vooronderzoeker (EOB)
München		13 November 2006	Bayer, Annette
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octroofamilie, corresponderende literatuur document			

EOB FORM 02 83 (P0414)



RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octrooiaanvraag Nr.:

NO 135751

NL 1031674

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
P, X	WO 2005/094446 A2 (LILLY CO ELI [US]; SMITH ROSAMUND CAROL [US]; KIKLY KRISTINE KAY [US];) 13 oktober 2005 (2005-10-13) * het gehele document *	1, 14-20, 22	
			Onderzochte gebieden van de techniek
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek		Datum waarop het onderzoek werd voltooid	Vooronderzoeker (EOB)
München		13 November 2006	Bayer, Annette
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octroofamilie, corresponderende literatuur document			

EOB FORM 02.83 (P0414)

GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING

Octrooiaanvraag Nr.:

NO 135751

NL 1031674

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

1. conclusies: 1, 14-20, 22

Een humaan, chimeer of gehumaniseerd monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan dat specifiek bindt aan myostatine, waarin genoemd antilichaam of gedeelte selectief ten minste 50-maal meer myostatine bindt dan GDF11, en waarin genoemd antilichaam of gedeelte myostatinebinding aan een activine type I of II receptor inhibeert.

2. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 2, 4, 45, 47 en soortgelijke materie.

3. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 6, 8, 49 en 51 en soortgelijke materie.

4. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 10, 12, 53 en 55 en soortgelijke materie.

5. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 14, 16, 57 en 59 en soortgelijke materie.

6. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 18, 20, 65 en 67 en soortgelijke materie.

7. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 22, 24, 69 en 71 en soortgelijke materie.

GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING

Octrooiaanvraag Nr.:

NO 135751
NL 1031674

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

8. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 26, 28, 77 en 79 en soortgelijke materie.

9. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 30, 32, 61 en 63 en soortgelijke materie.

10. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 34, 36, 73 en 75 en soortgelijke materie.

11. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 38, 40, 81 en 83 en soortgelijke materie.

12. conclusies: 3, 5, 6-8, 12-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 42, 44, 85 en 86 en soortgelijke materie.

13. conclusies: 3, 5-12, 14-20, 22

Een monoklonaal antilichaam of een antigeenbindend gedeelte daarvan omvattende de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 115, 117, 118 en 120 en soortgelijke materie.

Het vooronderzoek werd tot het eerste onderwerp beperkt.

**ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C**

Octroolaanvraag Nr.:

NO 135751

NL 1031674

Ofschoon de conclusies 15, 18-20 en 22 gericht zijn op een methode voor het therapeutisch behandelen van het menselijk of dierlijk lichaam, is het vooronderzoek uitgevoerd op basis van de veronderstelde werking van de verbinding/samenstelling.

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE OCTROOIAANVRAGE NR.**

NO 135751
NL 1031674

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per

De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

13-11-2006

In het rapport genoemd octrooigeschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 2004037861	A2	06-05-2004	AR 047392 A1	18-01-2006
			AU 2003274448 A1	13-05-2004
			BR 0315598 A	06-09-2005
			CA 2500490 A1	06-05-2004
			CN 1788019 A	14-06-2006
			EP 1554312 A2	20-07-2005
			JP 2006519583 T	31-08-2006
			KR 20050049558 A	25-05-2005
			MX PA05004225 A	20-09-2005
US 2003138422	A1	24-07-2003	GEEN	
WO 2004108157	A2	16-12-2004	AU 2004245025 A1	16-12-2004
			BR PI0410927 A	27-06-2006
			CA 2526669 A1	16-12-2004
			CN 1829532 A	06-09-2006
			EP 1635870 A2	22-03-2006
			KR 20060026860 A	24-03-2006
			MX PA05012965 A	09-03-2006
WO 2005094446	A2	13-10-2005	AU 2005227896 A1	13-10-2005