



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617345-4 A2**

(22) Data de Depósito: 05/10/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/22 2006.01
A61P 3/00 2006.01
A61P 21/00 2006.01
A61K 39/395 2006.01

(54) Título: **ANTICORPO MONOCLONAL
ANTIMIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
E SEU USO**

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2005 US 60/725,738

(73) Titular(es): Eli Lilly And Company

(72) Inventor(es): Andrew Ihor Korytko, Brian Edward Jones,
Julian Davies, Linda O. O'Bryan (Nee Tobias), Pamela Jean Mitchell,
Rong Wang, Rosamund Carol Smith

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006038817 de 05/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/047112 de 26/04/2007

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL ANTIMIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA, E SEU USOA presente invenção refere-se a anticorpos antimioestatina que são caracterizados como tendo uma alta afinidade e que podem ser anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, imunoconjugados dos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Os anticorpos da invenção são úteis para o aumento da massa muscular, aumento da densidade óssea, ou para o tratamento de vários distúrbios em espécies mamíferas e aviárias.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPO MONOCLONAL ANTIMIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E SEU USO".

Campo da Invenção

5 A presente invenção é do campo da medicina, particularmente do campo dos anticorpos monoclonais contra miostatina. Mais especificamente, a invenção está relacionada aos anticorpos antimiostatina quiméricos de alta afinidade, humanizados ou humanos, e ao uso dos anticorpos para terapia, profilaxia ou diagnóstico de vários distúrbios ou condições em espécies mamíferas e de aves.

10 Antecedentes da Invenção

Os membros da superfamília de proteínas do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) estão envolvidos no desenvolvimento embriológico e na homeostasia tecidual do adulto. Os membros da superfamília do TGF- β compartilham uma estrutura comum que inclui uma seqüência peptídica sinalizadora necessária à secreção da proteína e um fragmento do terminal amino que é clivado proteoliticamente a aproximadamente 105-140 aminoácidos do terminal carboxi da grande proteína precursora para produzir a proteína madura. A proteína madura é caracterizada por resíduos de cisteína altamente conservados, enquanto a forma ativa da proteína madura é um homodímero ligado por dissulfeto da pró-proteína clivada proteoliticamente (Gray, A., e Maston, A., *Science*, 247: 1.328, 1990).

A miostatina, também denominada fator de diferenciação do crescimento-8 (GDF-8), é um membro da superfamília de proteínas TGF- β . Ela compartilha similaridades estruturais com outros membros da família TGF- β . Ela contém um terminal amino hidrofóbico que atua como um sinal secretor e um domínio RSRR conservado que é importante para o processamento proteolítico. A clivagem da proteína dá origem a um peptídeo associado à latência do terminal amino e um peptídeo de sinalização maduro do terminal carboxi que forma o homodímero biologicamente ativo. A miostatina é expressa amplamente no músculo esquelético em desenvolvimento e adulto, e funciona como um regulador negativo do músculo esquelético. A superexpressão sistêmica de miostatina em camundongos adultos leva à destrui-

ção muscular (Zimmers, e outros, *Science*, 296: 1.486-1.488, 2002), enquanto, inversamente, um camundongo *knock-out* para miostatina é caracterizado por hipertrofia e hiperplasia do músculo esquelético, o que resulta em uma massa muscular duas a três vezes maior do que a de seus pares do tipo selvagem da prole, e uma diminuição do acúmulo de gordura (McPherron, e outros *Nature*, 387: 83-90, 1997). Foi relatado que um ser humano com uma mutação *knock-out* para miostatina estaria associado a uma hipertrofia muscular grosseira (Scheulke, e outros, *New Eng. J. Med.* 350: 2.682, 2004).

Atualmente, só estão disponíveis tratamentos limitados para a destruição muscular ou para distúrbios ou condições que pudessem se beneficiar de um aumento da massa muscular e/ou da força muscular incluindo, por exemplo, distrofia muscular, fraqueza, atrofia por desuso e caquexia, além de distúrbios que estão associados à destruição muscular, por exemplo, doença renal, insuficiência ou doença cardíaca, e doença hepática. Em função de sua participação como regulador negativo do crescimento muscular esquelético, miostatina é um alvo desejável para a intervenção terapêutica ou profilática desses distúrbios ou condições, ou para o monitoramento da progressão desses distúrbios ou condições. Além de sua participação direta na regulação de músculos esqueléticos, a miostatina também pode estar envolvida em outros processos fisiológicos que incluem a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (Kim e outros *BBRC*, 281: 902-906, 2001) e, indiretamente, com a homeostasia de glicose (McPherron, A. e Lee S-J. *JCI* 109: 595, 2002) e inibição da formação óssea (Hamrick, M. *Mol. Cell Evol. Biol.* 272: 388-91, 2003; Hamrick e outros *Calcif. Tissue Int.* 71: 63, 2002). Portanto, antagonistas específicos para miostatina, por exemplo, anticorpos específicos para miostatina, também podem se mostrar úteis para o tratamento, prevenção ou monitoramento de distúrbios ou condições como aqueles que se beneficiariam do aumento da densidade óssea (por exemplo, osteoporose), diabetes do Tipo II, síndrome metabólica, obesidade e osteoartrite.

Miostatina é altamente conservada entre espécies; a sequência de aminoácidos da forma madura de miostatina em seres humanos, camun-

5 dongos, ratos, galinhas, perus e vacas é 100% idêntica (vide as Figuras 2 e
 3). Há mutações de miostatina de ocorrência natural no gado, que foram as-
 sociadas a um fenótipo muscular duplo (McPherron, e outros *PNAS*, 94:
 12.457-61, 1997). Como a miostatina é altamente conservada em termos de
 10 seqüência e de função através de espécies, um anticorpo antimioestatina for-
 nece um meio promissor de aumento da massa muscular ou tratamento ou
 prevenção desses distúrbios ou condições listados acima não apenas em
 seres humanos, mas também em outros mamíferos incluindo, por exemplo,
 animais domésticos (por exemplo, caninos e felinos), animais de esportes
 15 (por exemplo, eqüinos), animais que servem como fonte de alimento (por
 exemplo, bovinos, suínos e ovinos) e em espécies aviárias (por exemplo,
 galinhas, perus, patos e outras aves de caça e aves domésticas).

O fator de diferenciação do crescimento-11, também denomi-
 nado GDF-11 ou BMP-11, é o membro da superfamília de proteínas TGF- β
 15 mais homólogo à miostatina. As seqüências de aminoácidos das formas ma-
 duras de miostatina e GDF-11 humanos são aproximadamente 90% idênti-
 cas; no entanto, GDF-11 é expresso em uma gama maior de tecidos do que
 GDF-8, incluindo a polpa dentária, cérebro, coração, rim e pulmão, além dos
 tecidos muscular e adiposo (Nakashima, e outros *Mech. of Development* 80:
 20 185, 1999). Camundongos *knock-out* para GDF-11 morrem em até 24 horas
 após o nascimento com múltiplas anormalidades. Especificamente, os ca-
 mundongos exibem pares extras de costelas, não possuem rins e exibem
 defeitos no estômago, baço e pâncreas (McPherron e outros, *Nature Gene-*
tics 22: 260, 1999; Esquela e Lee, *Dev. Biol.* 257: 356, 2003; Harmon e ou-
 25 tros, *Devpt.* 131: 6.163, 2004). Verificou-se recentemente que o GDF-11
 humano governa a janela temporal durante a qual progenitores múltiplos re-
 têm competência para produzir uma prole neural distinta (Kim, J. e outros
Science 308: 1.927-1.930, 2005).

Há uma necessidade terapêutica de um anticorpo antimioestatina
 30 que se ligue preferencialmente à miostatina em relação às outras proteínas
 da superfamília TGF- β , particularmente GDF-11. Além disso, há uma neces-
 sidade de anticorpos específicos para miostatina que se liguem à miostatina

com alta afinidade, particularmente uma afinidade mais elevada (isto é, uma afinidade mais forte demonstrada, por exemplo, por um valor K_D menor) do que aquela com que se ligam a GDF-11, permitindo, desse modo, que o nível de dosagem administrado aos pacientes seja minimizado, o que pode
5 resultar em dosagens menos freqüentes com esse anticorpo do que com um anticorpo que se ligue à miostatina com uma afinidade menor (isto é, um K_D mais elevado). Um anticorpo de alta afinidade também é desejável na medida em que ele poderia permitir maior flexibilidade na via de administração do anticorpo a um paciente, já que é menos desejável que um fármaco seja
10 administrado por via intravenosa do que por via subcutânea, por exemplo. Há também a necessidade de anticorpos específicos para miostatina com um valor IC_{50} baixo ou de algum outro modo favorável em um ensaio de bioatividade de miostatina, a fim de gerar um anticorpo antimioestatina terapêutico com uma dose terapêutica eficaz mínima. Também é desejável o fornecimento de anticorpos específicos para miostatina em que qualquer resposta
15 imunológica ao anticorpo desencadeada em um paciente que recebe o anticorpo seja reduzida a um mínimo. A presente invenção satisfaz essas necessidades e fornece vantagens relacionadas.

Sumário da Invenção

20 Os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais antimioestatina quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, e porções de ligação de antígeno destes, que antagonizam ou neutralizam pelo menos uma atividade biológica ou propriedade *in vitro* ou *in vivo* associada à miostatina ou a uma porção desta. De preferência, os anticorpos da invenção não se
25 ligam a um peptídeo que consiste nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 de miostatina madura, de preferência, miostatina humana, em níveis significativamente maiores do que o nível de fundo.

Em uma modalidade, os anticorpos da invenção possuem uma IC_{50} menor ou igual a cerca de 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM, mais
30 preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* (vide o Exemplo 5). De preferência, os anticorpos da invenção possuem uma IC_{50} em um ensaio

repórter de miostatina/SBE *in vitro* de pelo menos 20% ou 50% menor, mais preferivelmente, pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor do que a IC₅₀ do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* (como descrito no Exemplo 5 deste pedido).

5 Em uma modalidade, os anticorpos da invenção são caracterizados por uma forte afinidade de ligação (K_D) por miostatina, isto é, menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, menos de cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M. Alternativa-

10 mente, os anticorpos da invenção são caracterizados por uma K_D por miostatina de, no máximo, cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, no máximo cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, no máximo cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M.

15 Em outra modalidade, os anticorpos antimioestatina da invenção são caracterizados por se ligarem preferencialmente à miostatina em relação à proteína GDF-11 por pelo menos 20%, 30% ou 40%. De preferência, os anticorpos da invenção que se ligam preferencialmente à miostatina em relação a GDF-11 são ainda caracterizados por terem uma K_D por miostatina

20 de menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, menos de cerca de 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M. Em outra modalidade, os anticorpos da invenção que se ligam preferencialmente à miostatina em relação a GDF-11 são ainda caracterizados por terem uma IC₅₀ menor ou igual

25 a cerca de 40 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*.

 Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção compreende um polipeptídeo da região variável da cadeia leve

30 ("LCVR") com uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos SEQ. ID N^{os}: 74-102, 140, 141 e 142 (Figura 9). Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção compreende

um polipeptídeo da região variável da cadeia pesada ("HCVR") com uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 103-138 (Figura 10).

Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção compreende (i) um polipeptídeo da LCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 74-102, 140, 141 e 142, e (ii) um polipeptídeo da HCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 103-138. Em uma modalidade preferida, um anticorpo da invenção que compreende um polipeptídeo da LCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos com a SEQ. ID N^o como mostrado na Tabela 1 abaixo ainda compreende um polipeptídeo da HCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos com a SEQ. ID N^o do polipeptídeo da HCVR que corresponde à LCVR específica na Tabela 1 abaixo. Por exemplo, um anticorpo da invenção que compreende um polipeptídeo da LCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ. ID N^o: 88, de preferência, compreendendo ainda um polipeptídeo da HCVR que consiste em uma seqüência de aminoácidos da SEQ. ID N^o: 103 ou 119.

Tabela 1

(Seqüências de anticorpos preferidos da invenção)

LCVR	HCVR (SEQ. ID N ^{os})
74	103
75	104
76	104
77	103 ou 113
78	105
79	103
80	106
81	103, 104, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 117, 118
82	104
83	111
84	112

	85	113
	86	103, 108, 115
	87	116
	88	103, 119
5	89	103, 120, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134
	90	103, 121, 122
	91	121
	92	103, 121
	93	120
10	94	120
	95	120, 137
	96	120, 135
	97	120
	98	120, 138
15	99	120, 136, 138
	100	120
	101	135
	103	136
	140	137
20	141	123
	142	138

Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal da invenção é aquele que pode competir pela ligação à miostatina humana com um anti-corpo competidor como demonstrado por um ensaio disponível na técnica (por exemplo, um ELISA por competição), em que o anticorpo competidor compreende dois polipeptídeos com as seqüências selecionadas do grupo que consiste em: (i) SEQ. ID N^{os}: 98 e 138 e (ii) SEQ. ID N^{os}: 74 e 103.

Em uma modalidade, um anticorpo antimioestatina da invenção tem uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada compreende regiões CDR com as seguintes seqüências de aminoácidos: CDRH1 (SEQ ID N^o: 42), CDRH2 (SEQ ID N^o: 71) e CDRH3 (SEQ ID N^o: 72) (vide a Figura 7); e/ou

em que a região variável da cadeia leve compreende regiões CDR com as seguintes seqüências de aminoácidos: CDRL1 (SEQ ID Nº: 12), CDRL2 (SEQ ID Nº: 154) e CDRL3 (SEQ ID Nº: 37) (vide a Figura 6). De preferência, as CDRs da cadeia pesada de um anticorpo da invenção estão juntas em um anticorpo, como em um anticorpo mostrado na Figura 7, e as CDRs da cadeia leve de um anticorpo da invenção estão juntas em um anticorpo, como em um anticorpo mostrado na Figura 6.

Um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção pode ainda compreender a região constante da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD humanas (ou substancialmente de origem humana), de preferência, IgG₁ ou IgG₄. Um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção pode ainda compreender a região constante da cadeia leve kappa ou lambda humana. Quando o anticorpo for utilizado como uma substância terapêutica ou preventiva em um ser humano, a região constante será, de preferência, substancial ou inteiramente de origem humana. Quando o anticorpo for utilizado como uma substância terapêutica ou preventiva em um animal não humano, ou em um ovo de um animal não humano, a região constante de preferência se originará substancialmente do animal no qual o anticorpo será usado como substância terapêutica (vide, por exemplo, Clarkson, C. e outros, *Mol. Imm.* 30: 1.195-1.204, 1993; pedido U.S. número 2002/01651350; e números de acesso no Genbank X69797, UO3778, X16701, X07174, AB016711).

Várias formas do anticorpo são aqui contempladas. Por exemplo, um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção pode compreender ou consistir em um anticorpo intacto (isto é, de comprimento total, que possui uma região Fc intacta), um anticorpo substancialmente intacto, uma porção de ligação de antígeno deste (por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂) ou um fragmento Fv de cadeia simples. Entende-se que todas essas formas dos anticorpos são aqui englobadas e incluídas no termo "anticorpo". Além disso, um anticorpo da invenção pode ser marcado com um marcador detectável, imobilizado sobre uma fase sólida e/ou conjugado a um composto heterólogo, por exemplo, uma enzima ou uma molécula de polietileno glicol. Além

disso, os anticorpos da invenção são contemplados para serem de origem monoclonal, embora possam diferir em termos de padrão de glicosilação.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção. A composição farmacêutica da invenção pode ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável. Na referida composição farmacêutica, o anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção é o ingrediente ativo. De preferência, a composição farmacêutica compreende uma população homogênea ou substancialmente homogênea de um anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção. A composição para uso terapêutico é estéril e pode ser liofilizada, fornecida opcionalmente com um diluente apropriado.

A invenção fornece um método de inibição de pelo menos uma atividade biológica de miostatina em um animal, de preferência, uma espécie mamífera ou de aves, de preferência, um ser humano, que dela necessite, que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz, ou quantidade profilaticamente eficaz, ou quantidade neutralizante de miostatina ou inibidora de miostatina de um anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção à referida espécie mamífera ou de ave. A invenção ainda fornece um método de aumento da massa muscular ou de tratamento ou prevenção de uma doença ou um distúrbio ou uma condição atenuada pela neutralização ou antagonismo de uma bioatividade de miostatina que compreende a administração a um paciente (por exemplo, um ser humano) que necessita desse tratamento ou prevenção de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo monoclonal da invenção.

A invenção incorpora um anticorpo monoclonal antimiotatina da invenção para uso na fabricação de um medicamento para administração a um mamífero, de preferência, um ser humano, para o tratamento, por exemplo, de fraqueza, caquexia, sarcopenia relacionada à idade, destruição ou fraqueza muscular, miopatia, distrofia muscular, osteoporose, obesidade, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), insuficiência ou doença renal, insuficiência ou doença hepática, insuficiência ou doença cardíaca, síndrome metabólica e diabetes do Tipo II em um mamífero, de preferência, um ser

humano, que dele necessita por administração ao referido mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz de um anticorpo monoclonal antimiostatina da invenção.

5 A invenção incorpora um produto manufaturado que compreende um material de embalagem e um anticorpo da invenção contido dentro do referido material de embalagem e em que o material de embalagem compreende uma bula que indica que o anticorpo neutraliza uma atividade de miostatina ou diminui o nível de miostatina presente no sistema.

10 A invenção ainda fornece ácido nucléico isolado que codifica um anticorpo da invenção; um vetor (ou vetores) que compreende aquele ácido nucléico, opcionalmente ligado operacionalmente a seqüências de controle reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vetor; uma célula hospedeira que compreende aquele vetor; um processo para a produção de um anticorpo da invenção que compreende o cultivo da célula
15 hospedeira de forma que o ácido nucléico seja expresso e, opcionalmente, recuperação do anticorpo do meio de cultura da célula hospedeira.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra a seqüência de aminoácidos de pró-miostatina humana com a seqüência sinalizadora sublinhada e a porção da
20 proteína no terminal carbóxi que constitui um monômero da forma madura de miostatina em letras em negrito.

A Figura 2 mostra a seqüência de aminoácidos de miostatina monomérica madura humana. A miostatina humana ativa é um homodímero desse polipeptídeo associado por ligações dissulfeto. Essa seqüência é
25 idêntica àquela da miostatina madura em camundongos, ratos, galinhas, perus, cachorros, cavalos e porcos.

A Figura 3 mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos de miostatina madura de várias espécies mamíferas e aviárias.

A Figura 4 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido
30 da forma madura de miostatina humana e GDF-11 humano.

A Figura 5 mostra a seqüência de aminoácidos da HCVR e LC-VR do anticorpo YN41, um anticorpo original exemplar dos anticorpos da

invenção. A figura ainda mostra uma sequência de nucleotídeos exemplar que codifica a HCVR e LCVR do anticorpo YN41.

A Figura 6 mostra a sequência de aminoácidos de CDRs da LCVR de vários anticorpos da invenção.

5 A Figura 7 mostra a sequência de aminoácidos de CDRs da HCVR de vários anticorpos da invenção.

A Figura 8 mostra a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia leve kappa que pode estar ligada operacionalmente à LCVR de um anticorpo da invenção na geração de uma cadeia leve de comprimento total de um anticorpo da invenção e a sequência de aminoácidos de um domínio da região constante de IgG4 que pode estar ligado operacionalmente à HCVR de um anticorpo da invenção na geração de uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo da invenção. A figura ainda mostra uma sequência de nucleotídeos exemplar que codifica a região constante da cadeia leve kappa e uma sequência de nucleotídeos exemplar que codifica um domínio da cadeia pesada de IgG4.

10

15

A Figura 9 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos de LCVRs de vários anticorpos da invenção. Os domínios de CDR estão sublinhados na primeira sequência de anticorpo.

20 A Figura 10 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos de HCVRs de vários anticorpos da invenção. Os domínios de CDR estão sublinhados na primeira sequência de anticorpo.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção apresenta anticorpos monoclonais antimióstatina quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, ou porções de ligação de antígeno destes, capazes de neutralizar ou antagonizar pelo menos uma atividade de miostatina *in vitro* e/ou *in vivo*, caracterizados ainda por demonstrarem uma IC₅₀ de menos de cerca de 40 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* e/ou preferencialmente por demonstrarem uma forte afinidade de ligação com miostatina. Os anticorpos da invenção são ainda caracterizados pelo fato de se ligarem preferencial-

25

30

mente à miostatina em relação ao homólogo mais próximo da miostatina, GDF-11, por pelo menos 20%.

Definições

Quando aqui usado, o termo "miostatina madura" (vide a SEQ.

- 5 ID Nº: 2 para espécies humanas, murídeos, ratos, galinhas, perus, caninas, eqüinas e suínas) refere-se à forma monomérica ou homodimérica da proteína resultante após clivagem proteolítica em Arg 266 da forma de pró-proteína de 375 aminoácidos de miostatina. Quando aqui usado, o termo "miostatina" refere-se à miostatina madura. Quando aqui usado, o termo
- 10 "pró-miostatina" ou "forma de pró-proteína de miostatina", quando usado com referência à proteína humana, refere-se a uma proteína que compreende a seqüência mostrada na SEQ. ID Nº: 1, seja como monômero ou como homodímero.

- Um anticorpo de comprimento total, da forma que ele existe naturalmente, é uma molécula de imunoglobulina composta por quatro cadeias
- 15 peptídicas, duas cadeias pesadas (H) (com cerca de 50-70 kDa quando de comprimento total) e duas cadeias leves (L) (com cerca de 25 kDa quando de comprimento total) interconectadas por ligações dissulfeto. A porção amino terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110
- 20 ou mais aminoácidos, basicamente responsável pelo reconhecimento de antígeno. A porção carbóxi terminal de cada cadeia define uma região constante basicamente responsável pela função efetora.

- As cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda, e são caracterizadas por uma região constante em particular, como conhecido
- 25 na técnica. As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, e definem o isótipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente, e vários destes podem ainda ser divididos em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante em particular
- 30 conhecida na técnica. As estruturas e as configurações tridimensionais da subunidade das diferentes classes de anticorpos são bem-conhecidas na técnica. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia

pesada do terminal N (aqui denominada "HCVR") e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta por três domínios (CH1, CH2, e CH3) para IgG, IgD e IgA; e 4 domínios (CH1, CH2, CH3 e CH4) para IgM e IgE. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (aqui denominada "LCVR") e uma região constante da cadeia leve, CL. As regiões HCVR e LCVR podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), espaçadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada HCVR e LCVR é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino para o terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aqui, as 3 CDRs da cadeia pesada são denominadas "CDRH1, CDRH2 e CDRH3", e as 3 CDRs da cadeia leve são denominadas "CDRL1, CDRL2 e CDRL3". As CDRs contêm a maioria dos resíduos que formam interações específicas com o antígeno. CDR3 é tipicamente a principal fonte de diversidade molecular dentro do sítio de ligação de anticorpo. A atribuição de aminoácidos a cada domínio ocorre de acordo com convenções bem estabelecidas [por exemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ou o esquema de numeração de Chothia, como descrito em Al-Lazikani e outros, *J. Mol. Biol.* 273: 927-948, 1997; vide também a página da Internet <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs>. A habilidade funcional de um anticorpo para se ligar a um antígeno em particular é influenciada pelas seis CDRs.

O termo "anticorpo", em referência a um anticorpo monoclonal antimiosstatina da invenção (ou simplesmente "anticorpo monoclonal da invenção"), como aqui usado, refere-se a um anticorpo monoclonal. Um "anticorpo monoclonal", como aqui usado, refere-se a um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano, a menos que aqui indicado de forma diferente. De preferência, um anticorpo monoclonal da invenção existe em uma população homogênea ou substancialmente homogênea. Anticorpos monoclonais da invenção podem ser produzidos

com o uso, por exemplo, de tecnologias de hibridoma bem-conhecidas na técnica, além de tecnologias recombinantes, tecnologias de exibição de fago; tecnologias sintéticas ou combinações dessas tecnologias ou de outras tecnologias facilmente conhecidas na técnica. "Anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de uma única cópia ou clone, incluindo, por exemplo, qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago, e não ao método pelo qual é produzido. Um "anticorpo monoclonal" pode ser um anticorpo intacto (que compreende uma região Fc completa ou de comprimento total), um anticorpo substancialmente intacto ou uma porção ou fragmento de um anticorpo que compreende uma porção de ligação de antígeno, por exemplo, um fragmento Fab, fragmento Fab' ou fragmento F(ab')₂ de um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada formam os sítios de ligação de antígeno do anticorpo. Dessa forma, um anticorpo IgG intacto tem dois sítios de ligação. Exceto em anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois sítios de ligação são iguais. Como aqui usado, a "porção de ligação de antígeno" ou "região de ligação de antígeno" ou "fragmento de ligação de antígeno" refere-se aqui de forma intercambiável àquela porção de uma molécula de anticorpo, dentro da região variável, que contém os resíduos de aminoácidos que interagem com um antígeno e conferem ao anticorpo sua especificidade e afinidade pelo antígeno. Essa porção do anticorpo inclui os resíduos de aminoácidos estruturais necessários para manter a conformação adequada dos resíduos de ligação de antígeno. De preferência, as CDRs da região de ligação de antígeno dos anticorpos da invenção serão de origem murídeo ou substancialmente de origem murídeo com certos resíduos de aminoácidos alterados para melhorar uma atividade em particular (vide, por exemplo, as Figuras 6 e 7). De preferência, as regiões estruturais dos anticorpos da invenção são de origem humana ou substancialmente de origem humana (pelo menos 95%, 97% ou 99% de origem humana; vide, por exemplo, as Figuras 9 e 10). Em outras modalidades, a região de ligação de antígeno, ou as CDRs da região de ligação de antígeno, podem ser derivadas de outras espécies não humanas, incluindo, sem limita-

ção, coelho, rato ou hamster. Em outras modalidades, a região de ligação de antígeno pode ser inteiramente de origem humana ou substancialmente de origem humana, com certos resíduos de aminoácidos alterados para aumentar uma atividade em particular, por exemplo, afinidade ou especificidade (vide, por exemplo, as posições de aminoácidos das Figuras 6 e 7 que estão impressas em negrito e sublinhadas).

Além disso, um "anticorpo monoclonal", como aqui usado, pode ser um fragmento Fv de cadeia simples que pode ser produzido pela união do DNA que codifica a LCVR e HCVR com uma seqüência vinculadora (vide Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova York, páginas 269-315, 1994). Entende-se que, independentemente de se os fragmentos ou as porções são ou não especificados, o termo "anticorpo", como aqui usado, inclui esses fragmentos ou porções, bem como as formas de cadeia simples. Desde que a proteína retenha sua habilidade para se ligar específica ou preferencialmente ao seu alvo desejado (isto é, epítopo ou antígeno), ela está incluída dentro do termo "anticorpo".

Uma "população de anticorpos monoclonais" refere-se a uma população homogênea ou substancialmente homogênea de anticorpos (isto é, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, de preferência, pelo menos cerca de 97% ou 98% ou, principalmente, pelo menos 99% dos anticorpos na população competiriam em um ensaio ELISA pelo mesmo antígeno ou epítopo). Anticorpos podem ser ou não glicosilados e ainda assim estarem incluídos na invenção. Anticorpos monoclonais podem ser homogêneos caso tenham uma seqüência de aminoácidos idêntica, embora possam diferir em uma modificação pós-tradução, por exemplo, padrão de glicosilação.

Um anticorpo antimioestatina "variante" refere-se aqui a uma molécula que difere em termos de seqüência de aminoácidos de uma seqüência de aminoácidos "original" de anticorpo antimioestatina em virtude da adição, eliminação e/ou substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na seqüência de anticorpo original. Na modalidade preferida, a variante

- compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em uma ou mais regiões CDR do anticorpo original. Por exemplo, a variante pode compreender pelo menos uma (por exemplo, de cerca de uma a cerca de dez e, de preferência, de cerca de duas a cerca de cinco) substituição em uma ou mais
- 5 regiões CDR do anticorpo original. Identidade ou homologia com relação à seqüência variante é aqui definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos na seqüência variante que são idênticos aos resíduos do anticorpo original, após alinhamento das seqüências e introdução de lacunas ("*gaps*"), se necessário, para obter o percentual máximo de identidade de seqüências.
- 10 Nenhuma das extensões, eliminações ou inserções do terminal N, do terminal C ou internas na seqüência de anticorpo devem afetar a identidade ou homologia de seqüências. A variante retém a habilidade para se ligar à mios-
- 15 forte, IC_{50} menor em um ensaio SBE/repórter, ou habilidade aumentada para inibir uma bioatividade de miostatina. O anticorpo variante de interesse particular aqui apresentado é aquele que exibe um aumento de pelo menos cerca de 5 vezes, de preferência, pelo menos cerca de 10 vezes e, mais preferivelmente, de pelo menos cerca de 20, 30 ou 50 em uma atividade biológica,
- 20 ca, quando comparado como o anticorpo original.

O anticorpo "original" aqui citado é aquele que é codificado por uma seqüência de aminoácidos usada para a preparação da variante. O anticorpo original pode ter uma estrutura murídeo, mas, de preferência, tem uma região estrutural humana. O anticorpo original pode ser um anticorpo

25 murídeo (vide, por exemplo, Figuras x), quimérico, humanizado ou humano.

O termo "se liga especificamente", como aqui usado, refere-se à situação na qual um membro de um par de ligação específico não se liga significativamente a moléculas diferentes de seu(s) parceiro(s) de ligação específico(s), como medido por uma metodologia disponível na técnica, por

30 exemplo, ELISA por competição, ensaio BIACORE ou ensaio KINEXA. O termo também se aplica quando, por exemplo, um domínio de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção é específico para um epítipo em par-

5 ticular que existe em diversos antígenos, quando então o anticorpo específico que possui o domínio de ligação de antígeno será capaz de se ligar especificamente aos vários antígenos que possuem o epitopo. Conseqüentemente, um anticorpo monoclonal da presente invenção se liga especificamente a GDF-8 e GDF-11.

10 O termo "se liga preferencialmente", como aqui usado, refere-se à situação na qual um anticorpo se liga a um antígeno específico pelo menos cerca de 20% a mais do que ele se liga a um antígeno diferente, medido por uma metodologia disponível na técnica, por exemplo, ELISA por competição ou medida de KD com ensaio BIACORE ou KINEXA. Conseqüentemente, um anticorpo monoclonal da presente invenção se liga preferencialmente a GDF-8 em relação a GDF-11. Da mesma forma, um anticorpo pode se ligar preferencialmente a um epitopo dentro de um antígeno em relação a um epitopo diferente dentro do mesmo antígeno.

15 O termo "epitopo" refere-se àquela porção de uma molécula capaz de ser reconhecida e ligada por um anticorpo em uma ou mais das regiões de ligação de antígeno do anticorpo. Epitopos freqüentemente consistem em um agrupamento de superfície quimicamente ativo de moléculas, tais como cadeias laterais de aminoácidos ou de açúcar que possuem características estruturais tridimensionais específicas, além de características de carga específicas. "Epitopo de inibição" e/ou "epitopo neutralizante" significa 20 um epitopo, o qual, quando no contexto da molécula intacta (nesse caso, miostatina) e quando ligado por anticorpo específico para o epitopo, resulta na perda ou diminuição de uma atividade biológica da molécula ou organismo que contém molécula, *in vivo* ou *in vitro*.

25 O termo "epitopo", como aqui usado, ainda refere-se a uma porção de um polipeptídeo que possui atividade antigênica e/ou imunogênica em um animal, de preferência, um mamífero, por exemplo, um camundongo ou um ser humano. O termo "epitopo antigênico", como aqui usado, é definido como uma porção de um polipeptídeo à qual um anticorpo pode se ligar especificamente, como determinado por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por imunoensaios convencionais. Epitopos antigênicos 30

não precisam necessariamente ser imunogênicos, mas podem ser imunogênicos. Um "epitopo imunogênico", como aqui usado, é definido como uma porção de um polipeptídeo que desperta uma resposta de anticorpo em um animal, como determinado por qualquer método conhecido na técnica (vide, 5 por exemplo; Geysen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3.998-4.002 (1983)).

As frases "propriedade biológica" ou "bioatividade", "atividade" ou "atividade biológica", em referência a um anticorpo da presente invenção, são aqui usadas de forma intercambiável, e incluem, sem limitação, afinida- 10 de e especificidade de epitopo/antígeno, habilidade para neutralizar ou antagonizar uma atividade de miostatina *in vivo* ou *in vitro*, IC₅₀ em um ensaio repórter de miostatina/SBE ou outro ensaio de atividade *in vitro*, a estabilidade *in vivo* do anticorpo, e as propriedades imunogênicas do anticorpo. Outras propriedades biológicas identificáveis de um anticorpo incluem, por e- 15 xemplo, reatividade cruzada (isto é, com homólogos não humanos do peptídeo-alvo, ou com outras proteínas ou tecidos, geralmente), e a habilidade para preservar níveis elevados de expressão de proteína em células mamíferas. As propriedades ou características mencionadas anteriormente podem ser observadas ou medidas ou avaliadas com o uso de metodologias reco- 20 nhecidas na técnica, incluindo, sem limitação, ELISA, ELISA competitivo, análise de ressonância de plasmônio de superfície, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* sem limite, ligação de receptor, produção e/ou secreção de citocina ou de fator de crescimento, desenvolvimento de capuz animal de *Xenopus*, transdução de sinal e imunoistoquímica com cortes de tecido de 25 diferentes fontes, incluindo humanos, primatas ou qualquer outra fonte, como necessário.

O termo "atividade de miostatina", como aqui usado, refere-se a uma ou mais das atividades reguladoras do crescimento ou morfogenéticas fisiologicamente associadas à proteína miostatina ativa. Por exemplo, mios- 30 tatina ativa é um regulador negativo da massa muscular esquelética. Miostatina ativa também pode modular a produção de enzimas específicas para músculos (por exemplo, creatina quinase), estimular a proliferação de mio-

blastos, e modular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos.

5 O termo "inibir" ou "neutralizar", como aqui usado, com relação a uma atividade de um anticorpo da invenção, significa a habilidade para substancialmente antagonizar, proibir, evitar, restringir, tornar mais lenta, romper, eliminar, interromper, reduzir ou reverter, por exemplo, a progressão ou a gravidade daquilo que está sendo inibido, incluindo, sem limitação, uma atividade biológica ou propriedade, uma doença ou uma condição. A inibição ou neutralização é preferivelmente de pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais.

10 O termo "isolado", quando usado em relação a um ácido nucléico ou a uma proteína (por exemplo, um anticorpo), refere-se a uma sequência de ácidos nucléicos ou a uma proteína que é identificada e separada de pelo menos um contaminante com o qual está normalmente associada em sua fonte natural. De preferência, um "anticorpo isolado" é um anticorpo que
15 é substancialmente livre de outros anticorpos que possuem diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, composições farmacêuticas da invenção que compreendem um anticorpo isolado que se liga especificamente à miostatina e é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos diferentes de miostatina).

20 Os termos "numeração de Kabat" e "marcação de Kabat" são aqui usados de forma intercambiável. Esses termos, que são reconhecidos na técnica, referem-se a um sistema de numeração de resíduos de aminoácidos que são mais variáveis (isto é, hipervariáveis) do que outros resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo (Kabat, e outros, *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-93 (1971); Kabat, e outros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, "U.S. Department of Health and Human Services", Publicação NIH Nº 91-3.242
25 (1991)).

30 Um polinucleotídeo está "ligado operacionalmente" quando é colocado em um relacionamento funcional com outro polinucleotídeo. Por exemplo, um promotor ou intensificador está ligado operacionalmente a uma sequência codificadora caso ele afete a transcrição da sequência. Um peptí-

deo está "ligado operacionalmente" a outro peptídeo quando os polinucleotídeos que o codificam estão ligados operacionalmente, de preferência, estão no mesmo quadro de leitura aberta.

Os termos "indivíduo", "pessoa" e "paciente", aqui usados de forma intercambiável, referem-se a um animal, de preferência, uma espécie mamífera (incluindo um não primata e um primata) ou aviária, incluindo, sem limitação, murídeos, símios, humanos, animais mamíferos de criação (por exemplo, bovinos, suínos, ovinos), animais mamíferos de esportes (por exemplo, eqüinos) e animais mamíferos de estimação (por exemplo, caninos e felinos); de preferência, o termo refere-se a seres humanos. O termo também refere-se às espécies aviárias, incluindo, sem limitação, galinhas e perus. Em uma certa modalidade, o indivíduo, de preferência, um mamífero, de preferência, um ser humano, é ainda caracterizado por uma doença ou um distúrbio ou uma condição que se beneficiaria de um nível diminuído ou bioatividade diminuída de miostatina. Em outra modalidade, o indivíduo, de preferência, um mamífero, de preferência, um ser humano, é ainda caracterizado como em risco para o desenvolvimento de um distúrbio, uma doença ou condição que se beneficiaria de um nível diminuído de miostatina ou uma bioatividade diminuída de miostatina.

O termo "vetor" inclui uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual foi ligado, incluindo, sem limitação, plasmídeos e vetores virais. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos, enquanto outros vetores podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira mediante introdução na célula hospedeira e, dessa forma, são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão ligados operacionalmente. Tais vetores são aqui denominados "vetores de expressão recombinante" (ou simplesmente "vetores de expressão"), e vetores exemplares são bem conhecidos na técnica.

Como aqui usadas, as expressões "célula", "célula hospedeira", "linhagem celular" e "cultura de células" são usadas de forma intercambiável

e incluem uma célula ou cultura de células individual que é receptora de qualquer polinucleotídeo isolado da invenção ou qualquer vetor(s) recombinante(s) que compreende uma seqüência que codifica uma HCVR, LCVR ou um anticorpo monoclonal da invenção. Células hospedeiras incluem a prole de uma única célula hospedeira, e a prole pode não ser necessariamente completamente idêntica (em termos de morfologia ou no complemento de DNA total) à célula-mãe original em função de mutação e/ou alteração natural, acidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transformadas, transduzidas ou infectadas *in vivo* ou *in vitro* com um ou mais vetores recombinantes ou um polinucleotídeo que expressa um anticorpo monoclonal da invenção ou uma cadeia leve ou cadeia pesada deste. Uma célula hospedeira que compreende um vetor recombinante da invenção (incorporado estavelmente no cromossomo do hospedeiro ou não) também pode ser denominada "célula hospedeira recombinante". Células hospedeiras preferidas para uso na invenção são células CHO (por exemplo, ATCC CRL-9096), células NSO, células SP2/0 e células COS (ATCC, por exemplo, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Células hospedeiras adicionais para uso na invenção incluem células de plantas, células de leveduras, outras células mamíferas e células procarióticas.

20 Caracterização do Anticorpo

A presente invenção está relacionada a anticorpos monoclonais isolados que se ligam especificamente à miostatina com alta afinidade. Os anticorpos da invenção são, de preferência, anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos, ou porções de ligação de antígeno destes. Além disso, os anticorpos da invenção neutralizam ou antagonizam uma atividade biológica de miostatina *in vivo* ou *in vitro*. A ligação específica dos anticorpos monoclonais antimioestatina da invenção à miostatina permite que os anticorpos da invenção sejam usados como substâncias terapêuticas ou profiláticas para condições, doenças ou distúrbios associados à miostatina, isto é, condições, doenças ou distúrbios que se beneficiam da diminuição dos níveis de miostatina ou do antagonismo ou da inibição de uma atividade biológica de miostatina.

Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um anticorpo monoclonal antimiostatina que se liga à miostatina ou a uma porção desta com uma afinidade de ligação (K_D) por miostatina de menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, menos de cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M. Alternativamente, os anticorpos da invenção são caracterizados por uma K_D por miostatina de, no máximo, cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, no máximo cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, no máximo cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M. As afinidades dos anticorpos podem ser determinadas como descrito nos exemplos que serão apresentados abaixo.

De preferência, tais anticorpos da invenção caracterizados por uma forte afinidade de ligação, como aqui descritos, também possuem uma IC_{50} de menos de 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*. Ainda mais preferivelmente, os anticorpos caracterizados por uma forte afinidade de ligação, como aqui descritos, possuem uma IC_{50} em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* pelo menos 20% menor, mais preferivelmente, pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor do que a IC_{50} do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* (como descrito no Exemplo 5). De preferência, tais anticorpos da invenção caracterizados por uma forte afinidade de ligação, como aqui descritos, são ainda caracterizados pelo fato de que reagem preferencialmente com GDF-8 em relação a GDF-11 por pelo menos 20%, como medido por uma metodologia da técnica, por exemplo, por ELISA por competição ou por ensaio BIACORE ou KINEXA, para demonstrar pelo menos 20% a mais de afinidade (isto é, menor K_D) do anticorpo para GDF-8 do que GDF-11. De preferência, tais anticorpos da invenção caracterizados por uma forte afinidade de ligação, como aqui descritos, são ainda caracterizados pelo fato de que não se ligam a um peptídeo que consiste nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 de miostatina madu-

ra, de preferência, miostatina humana.

Em outra modalidade preferida, a invenção fornece um anticorpo monoclonal antimioestatina que tem uma IC_{50} menor ou igual a cerca de 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*. Ainda mais preferivelmente, a IC_{50} do anticorpo monoclonal antimioestatina em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* é pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor do que a IC_{50} do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* (como descrito no Exemplo 5 abaixo). Os anticorpos da invenção com uma IC_{50} como descrita acima podem ainda ser caracterizados por uma K_D por miostatina de menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, menos de cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M; alternativamente, uma K_D por miostatina de, no máximo, cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, no máximo cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, no máximo cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M; cuja K_D por miostatina é pelo menos cerca de 20% menor do que a que o anticorpo tem por GDF-11. Os anticorpos da invenção com uma IC_{50} como descrita acima podem ainda ser caracterizados por se ligar preferencialmente à miostatina por pelo menos cerca de 20%, de preferência, pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes, quando comparada com sua habilidade para se ligar a GDF-11 com o uso de um método disponível na técnica, por exemplo, um ensaio E-LISA ou um ensaio ELISA competitivo ou um valor de K_D medido, por exemplo, com um ensaio BIACORE ou KINEXA. Os anticorpos da invenção com uma IC_{50} como descrita acima podem ainda ser caracterizados por não se ligarem a um peptídeo que consiste nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 de miostatina madura, de preferência, miostatina humana, em níveis significativamente maiores do que o nível de fundo (por exemplo, em um ensaio ELISA).

De preferência, os polipeptídeos de miostatina e GDF-11 testa-

dos quanto à ligação preferencial de um anticorpo da invenção são, ambos, formas homodiméricas da proteína madura, de preferência, de origem mamífera ou aviária, ainda mais preferivelmente de origem humana. No entanto, os polipeptídeos de miostatina e GDF-11 testados quanto à ligação preferencial de um anticorpo da invenção podem ser a forma monomérica da proteína madura ou uma forma de pró-proteína.

Anticorpos monoclonais podem ser feitos com o uso do método de hibridoma amplamente conhecido na técnica (vide, por exemplo, Kohler e outros, *Nature*, 256: 495, 1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (por exemplo, como na Patente U.S. Nº 4.816.567). Geralmente, um hibridoma pode ser produzido pela fusão de uma linhagem celular imortal adequada (por exemplo, uma linhagem celular de mieloma, por exemplo, SP2/0) com células produtoras de anticorpo do animal imunizado. As células produtoras de anticorpo, de preferência, as do baço ou dos linfonodos, são obtidas de animais imunizados com o antígeno de interesse. As células fundidas (hibridomas) podem ser isoladas com a utilização de condições seletivas de cultura, e clonadas por diluição limitante. O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem é testado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. De preferência, a especificidade de ligação dos mabs produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, por exemplo, radioimunoensaio (RIA) ou ELISA. As células que produzem anticorpos com as propriedades de ligação desejadas podem ser selecionadas por um ensaio de rastreamento adequado. Métodos para esse isolamento e rastreamento são bem-conhecidos na técnica.

Outros métodos adequados de produção ou isolamento de anticorpos da invenção podem ser usados, incluindo, por exemplo, métodos que selecionam um anticorpo recombinante (por exemplo, Fv ou Fab de cadeia simples) de uma biblioteca, ou que se baseiam na imunização de animais transgênicos (por exemplo, camundongos) capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos (vide, por exemplo, Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555, 1993; Jakobovits e outros, *Nature*, 362:

255-258, 1993; Lonberg e outros, Patente U.S. Número 5.545.806; Surani e outros, Patente U.S. Número 5.545.807).

Anticorpos de cadeia simples e anticorpos quiméricos, humanizados ou "primatizados" (enxertados com CDR), além de anticorpos de cadeia simples quiméricos ou enxertados com CDR, e similares, que compreendem porções derivadas de espécies diferentes, também são englobados pela presente invenção e pelo termo "anticorpo". As várias porções desses anticorpos podem ser unidas quimicamente por técnicas convencionais, sinteticamente, ou podem ser preparadas como uma proteína contígua com o uso de técnicas de engenharia genética. Por exemplo, ácidos nucleicos que codificam uma cadeia quimérica ou humanizada podem ser expressos para produzir uma proteína contígua. Vide, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.816.567; Patente Européia Nº 0.125.023 B1; Patente U.S. Nº 4.816.397; Patente Européia Nº 0.120.694 B1; WO 86/01533; Patente Européia Nº 0.194.276 B1; Patente U.S. Nº 5.225.539; Patente Européia Nº 0.239.400 B1 e Patentes U.S. Nºs 5.585.089 e 5.698.762. Vide também, Newman, R. e outros *BioTechnology*, 10: 1.455-1.460, 1993, em relação ao anticorpo "primatizado", e Ladner e outros, Patente U.S. Nº 4.946.778 e Bird, R.E. e outros, *Science*, 242: 423-426, 1988, em relação aos anticorpos de cadeia simples.

Além disso, também podem ser produzidas porções funcionais de anticorpos, incluindo porções de ligação de antígeno de anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou de cadeia simples. Porções funcionais dos anticorpos citados anteriormente retêm pelo menos uma função de ligação de antígeno e/ou função biológica ou bioatividade do anticorpo de comprimento total do qual são derivadas. Porções funcionais preferidas retêm uma função de ligação de antígeno de um anticorpo de comprimento total correspondente (por exemplo, a habilidade para se ligar a uma forma mamífera madura de miostatina). Porções ou fragmentos funcionais particularmente preferidos retêm a habilidade para inibir uma ou mais funções ou características de bioatividades de uma miostatina mamífera madura, por exemplo, uma atividade de ligação, uma atividade de sinalização, e/ou esti-

mulação de uma resposta celular. Por exemplo, em uma modalidade, uma porção ou fragmento funcional pode inibir a interação de miostatina madura com um ou mais de seus ligantes e/ou pode inibir uma ou mais das funções mediadas por receptor.

5 Porções ou fragmentos de anticorpos capazes de ligação à miostatina madura incluem, sem limitação, fragmentos Fv, Fab, Fab' e F(ab')₂, e são englobados pela invenção. Tais fragmentos podem ser produzidos por clivagem enzimática ou por técnicas recombinantes. Por exemplo, a clivagem com papaína ou pepsina pode gerar fragmentos Fab ou F(ab')₂, respec-

10 tivamente. O menor fragmento de ligação de antígeno é o Fv, que consiste nos domínios HCVR e LCVR. O fragmento Fab consiste nos domínios HCVR-CH1 e LCVR-CL ligados covalentemente por uma ligação dissulfeto entre as regiões constantes. Para superar a tendência de os domínios HCVR e LCVR ligados de forma não covalente no Fv se dissociarem quando co-

15 expressos em uma célula hospedeira, pode ser construído um denominado fragmento Fv de cadeia simples (sc) (scFv), no qual um polipeptídeo flexível e adequadamente longo liga o terminal C da HCVR ao terminal N da LCVR, ou o terminal C da LCVR ao terminal N da HCVR. O vinculador usado mais comumente tem sido um peptídeo de 15 resíduos (Gly₄Ser)₃, mas outros

20 vinculadores também são conhecidos na técnica. Anticorpos também podem ser produzidos em diversas formas truncadas com o uso de genes de anticorpos nos quais um ou mais códons de parada foram introduzidos acima do sítio de parada natural. Por exemplo, um gene quimérico que codifica uma porção da cadeia pesada de F(ab')₂ pode ser designado para incluir seqüên-

25 cias de DNA que codificam o domínio CH1 e a região de dobradiça da cadeia pesada.

A seleção dos fragmentos de anticorpo de bibliotecas com a utilização de tecnologias de enriquecimento, por exemplo, exibição de fago (Matthews DJ e Wells J.A. *Science*. 260: 1113-7, 1993), exibição de ribosomo (Hanes, e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95: 14130-5, 1998), exi-

30 bição bacteriana (Samuelson P., e outros, *Journal of Biotechnology*. 96: 129-54, 2002), ou exibição de levedura (Kieckhefer M.C, e outros, *Protein Enginee-*

ring, 10: 1303-10, 1997), provou ser uma abordagem bem-sucedida à tecnologia clássica de hibridoma (revisões recentes: Little M. e outros, *Immunology Today*, 21: 364-70, 2000;).

Anticorpos Variantes

- 5 Um anticorpo monoclonal de murídeo ou um anticorpo humano (produzido, por exemplo, em um camundongo transgênico) gerado contra miostatina ou contra uma proteína que compreende um epitopo imunogênico da invenção é um anticorpo original. Um anticorpo original de murídeo pode ainda ser alterado para criar uma forma quimérica ou humanizada do anti-
- 10 corpo com o uso de métodos bem-conhecidos na técnica. Esses anticorpos quiméricos ou humanizados podem servir como anticorpos originais para variação ou mutagênese adicional. Os anticorpos originais da invenção podem ainda sofrer mutagênese, por exemplo, dentro do(s) domínio(s) de CDR (vide, por exemplo, as Figuras 6 e 7) para criar um anticorpo variante com
- 15 uma propriedade de interesse otimizada, por exemplo, afinidade de ligação, IC_{50} , especificidade etc. Prefere-se uma variante de anticorpo por substituição de aminoácidos que possui pelo menos um resíduo de aminoácido da molécula do anticorpo original removido, e um resíduo diferente inserido em seu lugar. Os sítios de maior interesse para mutagênese por substituição
- 20 incluem as regiões CDR, mas alterações de FR também são contempladas. Substituições conservadoras de aminoácidos são preferidas. Caso essas substituições resultem em uma mudança em uma atividade biológica do anticorpo, podem ser introduzidas mais mudanças substanciais, isto é, mudanças não conservadoras de aminoácidos, e os produtos podem ser avaliados.
- 25 Uma forma conveniente para a geração de variantes por substituição é a maturação da afinidade com o uso de exibição de fago. Resumidamente, vários sítios da região CDR são mutados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpo assim geradas são exibidas de forma monovalente por partículas de
- 30 fagos como fusões ao produto do gene III de M13 compactadas dentro de cada partícula. As variantes exibidas por fago são então rastreadas quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação, especificidade,

IC₅₀), como aqui apresentado. A fim de identificar sítios da região CDR candidatos à modificação, pode ser efetuada mutagênese por varredura de alanina para identificar resíduos da região CDR que contribuem significativamente para a ligação de antígeno. Alternativamente, ou além disso, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristal do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e a miostatina. Esses resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para a substituição de acordo com as metodologias aqui elaboradas ou conhecidas na técnica. Alternativamente, ou fora isso, pode ser realizada mutagênese aleatória em uma ou mais seqüências de CDR em uma ou mais posições de resíduos, enquanto a CDR está ligada operacionalmente à região variável ou enquanto a CDR é independente de outra seqüência da região variável, e após o retorno da CDR alterada à região variável com o uso de tecnologia de DNA recombinante. Após a geração dos anticorpos variantes, o painel de variantes é submetido a um rastreamento, como aqui descrito, e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento posterior.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada de um anticorpo antimioestatina da invenção pode ser substituído, geralmente por serina, para aumentar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar a reticulação aberrante. Inversamente, podem ser adicionadas ligações de cisteína ao anticorpo para aumentar sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo for um fragmento de anticorpo, por exemplo, um fragmento Fv).

Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Alteração significa a eliminação de uma ou mais porções de carboidrato encontradas no anticorpo, e/ou a adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo original.

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ligada ao N ou ligada ao O. Ligada ao N refere-se à adesão da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. A seqüência tripeptídica asparagina-X-

serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido, exceto prolina, constitui as seqüências de reconhecimento para a adesão enzimática da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Dessa forma, a presença de uma dessas seqüências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. A glicosilação ligada ao O refere-se à adesão de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usadas.

A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é obtida convenientemente por alteração da seqüência de aminoácidos de tal forma que ela contenha uma ou mais das seqüências tripeptídicas descritas acima (para sítios de glicosilação ligada ao N). A alteração também pode ser feita por adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à seqüência do anticorpo original (para sítios de glicosilação ligada ao O).

Seqüência

Um anticorpo monoclonal da invenção preferido compreende uma LCVR compreendendo um peptídeo com uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 74-102, 140, 141 e 142 (Figura 9) e/ou uma HCVR que compreende um peptídeo com uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 103-138 (Figura 10). Em uma modalidade preferida, um anticorpo da invenção que compreende um polipeptídeo da LCVR que compreende uma seqüência de aminoácidos com um SEQ ID N^o, como mostrado na Tabela 1, compreende ainda um polipeptídeo da HCVR que consiste em uma seqüência de aminoácidos com a SEQ. ID N^o do polipeptídeo da HCVR que corresponde à LCVR específica na Tabela 1 deste pedido. Os versados na técnica perceberão que os anticorpos da invenção não se limitam às seqüências específicas de HCVR e LCVR como definidas nas Figuras 9 e 10 deste pedido, mas também incluem variantes dessas seqüências que retêm a habilidade de ligação de antígeno e outras propriedades funcionais dos anticorpos da invenção. Tais variantes podem ser derivadas das seqüências fornecidas com o uso de metodologias conhecidas na técnica, como aqui descrito.

Além disso, um anticorpo monoclonal da invenção é aquele que é inibido competitivamente da ligação à miostatina madura humana (ou uma porção desta) por um anticorpo competidor monoclonal que compreende dois polipeptídeos com as seqüências selecionadas do grupo que consiste

5 (i) nas SEQ. ID N^{os}: 98 e 138 e (ii) nas SEQ. ID N^{os}: 74 e 103. Essa inibição competitiva entre anticorpos pode ser medida por ensaios facilmente conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, um ensaio de ELISA por competição.

De preferência, um anticorpo da invenção que compete com o

10 anticorpo competidor definido acima é ainda caracterizado por se ligar preferencialmente a GDF-8 em relação a GDF-11 por pelo menos 20%, 30% ou 40%, como medido por uma metodologia da técnica, por exemplo, por ELISA por competição ou por ensaio BIACORE ou KINEXA, para demonstrar pelo menos 20%, 30% ou 40% a mais de afinidade (isto é, menor K_D) do anticorpo

15 para GDF-8 do que GDF-11. De preferência, um anticorpo da invenção que compete com o anticorpo competidor definido acima é ainda caracterizado por ter uma K_D por miostatina de menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, menos de cerca de 8×10^{-11} M, $7 \times$

20 10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M; ou, alternativamente, é caracterizado por uma K_D por miostatina de, no máximo, cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, no máximo cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, no máximo cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M, e/ou é ainda caracterizado por ter uma IC_{50} menor

25 ou igual a cerca de 40 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*.

Ainda mais preferivelmente, um anticorpo da invenção que compete com o anticorpo competidor definido acima é ainda caracterizado

30 por uma IC_{50} em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* que é menor ou igual a cerca de 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um

ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*. Ainda mais preferivelmente, a IC₅₀ do anticorpo monoclonal antimiostatina em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* é pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor do que a IC₅₀ do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* (como descrito no Exemplo 5 neste pedido). Ainda mais preferivelmente, um anticorpo da invenção que compete com o anticorpo competidor definido acima é ainda caracterizado por não se ligar a um peptídeo que consiste nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 de miostatina madura, de preferência, miostatina humana.

10 Em uma modalidade, um anticorpo de antimiostatina da invenção tem uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada compreende regiões CDR com as seguintes seqüências de aminoácidos: CDRH1 (SEQ ID Nº: 42), CDRH2 (SEQ ID Nº: 71) e CDRH3 (SEQ ID Nº: 72) (vide a Figura 7);
15 e/ou em que a região variável da cadeia leve compreende regiões CDR com as seguintes seqüências de aminoácidos: CDRL1 (SEQ ID Nº: 12), CDRL2 (SEQ ID Nº: 154) e CDRL3 (SEQ ID Nº: 37). De preferência, as CDRs da cadeia pesada de um anticorpo da invenção são como mostradas na Figura 7, e as CDRs da cadeia leve de um anticorpo da invenção são como mostradas na Figura 6.
20

 Contempla-se ainda que um anticorpo antimiostatina da invenção compreenda a HCVR que compreende uma CDRH1 compreendendo uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID Nºs: 38-41, e/ou uma CDRH2 que compreende uma seqüência selecionada do grupo
25 que consiste nas SEQ. ID Nºs: 43-70 e 73, e/ou uma CDRH3 que compreende a seqüência da SEQ. ID Nº: 72. Em outra modalidade, um anticorpo antimiostatina da invenção compreende uma LCVR que compreende uma CDRL1 compreendendo uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID Nºs: 9-11, e/ou uma CDRL2 que compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID Nºs: 13-23, e/ou uma CDRL3 que compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID Nos: 24-36. Em uma modalidade preferida, um anticorpo anti-
30

miostatina da invenção compreende uma CDRH1 que compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 38-42, e/ou uma CDRH2 que compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 43-70 e 73, e/ou uma CDRH3 que compreende a
5 sequência da SEQ. ID N^o: 72, e compreende ainda uma LCVR que compreende uma CDRL1 compreendendo uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 9-11, e/ou uma CDRL2 que compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ. ID N^{os}: 13-23, e/ou uma CDRL3 que compreende uma sequência selecionada do grupo que
10 consiste nas SEQ. ID N^{os}: 24-36.

A estrutura que compreende uma CDR da invenção será geralmente uma sequência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou uma porção substancial desta, em que a CDR está localizada em uma localização que corresponde à CDR de HCVR e LCVR de ocorrência natural (Kabat e
15 outros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", "US Dept of HHS", 1991). As três regiões CDR para cada cadeia, leve e pesada, são fornecidas em uma região estrutural como uma sequência contígua representada pela seguinte fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. As FR1, FR2, FR3 e FR4 da cadeia pesada ou cadeia leve se combinam para formar
20 a estrutura central completa, quando dispostas como uma sequência contígua com as CDRs na ordem estabelecida. De preferência, as regiões estruturais de um anticorpo da invenção são de origem humana, humanizada ou substancialmente humana.

Em um anticorpo humanizado para uso terapêutico em seres
25 humanos, a sequência estrutural é, de preferência, inteira ou substancialmente de origem humana (isto é, pelo menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de origem humana). De preferência, a região estrutural da cadeia leve de um anticorpo humanizado, humano ou quimérico da invenção é como mostrada na Figura 9, composta de FR1 com SEQ ID N^o: 143, FR2
30 com SEQ ID N^o: 144, FR3 com SEQ ID N^o: 145, e FR4 com SEQ ID N^o: 146 ou 147. De preferência, a região estrutural da cadeia pesada de um anticorpo humanizado, humano ou quimérico da invenção é como mostrada na Fi-

gura10, composta de FR1 com SEQ ID Nº: 148 ou 149, FR2 com SEQ ID Nº: 150 ou 151, FR3 com SEQ ID Nº: 152 ou 153, e FR4 com SEQ ID Nº: 139. Por exemplo, o anticorpo 374/C1E4 compreende uma região variável da cadeia leve composta por FR1 com SEQ ID Nº: 143, CDR1 com SEQ ID Nº: 9, FR2 com SEQ ID Nº: 144, CDR2 com SEQ ID Nº: 18, FR3 com SEQ ID Nº: 145, CDR3 com SEQ ID Nº: 25, e FR4 com SEQ ID Nº: 146. O anticorpo 3-74/C1E4 ainda compreende uma região variável da cadeia pesada composta de FR1 com SEQ ID Nº: 149, CDR1 com SEQ ID Nº: 40, FR2 com SEQ ID Nº: 151, CDR2 com SEQ ID Nº: 60, FR3 com SEQ ID Nº: 153, CDR3 com SEQ ID Nº: 72, e FR4 com SEQ ID Nº: 139. Em um anticorpo para uso em um animal não humano, a sequência da região estrutural pode se originar substancialmente do genoma humano (de preferência, usada em um animal não humano quando ainda embrião ou recém-nascido) ou do genoma do animal no qual será usada terapeuticamente.

Em uma modalidade, um anticorpo antimiostatina da invenção em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência em particular, como mostrado por um SEQ ID Nº deste pedido, é ainda caracterizado por ser um anticorpo quimérico, humanizado ou totalmente humano, ou porção de ligação de antígeno deste, que antagoniza ou neutraliza pelo menos uma atividade de miostatina *in vivo* ou *in vitro*. Um anticorpo antimiostatina da invenção em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência em particular, como mostrado por um SEQ ID Nº deste pedido, é ainda caracterizado por se ligar preferencialmente a GDF-8 em relação a GDF-11 por pelo menos 20%, 30% ou 40%, como medido por uma metodologia da técnica, por exemplo, por ELISA por competição ou por ensaio BIACORE ou KINEXA, para demonstrar pelo menos 20%, 30% ou 40% a mais de afinidade (isto é, menor K_D) do anticorpo para GDF-8 do que para GDF-11. De preferência, um anticorpo da invenção em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência em particular, com mostrado por um SEQ ID Nº deste pedido, é ainda caracterizado por ter uma K_D por miostatina de menos de cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, menos de cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e,

mais preferivelmente, menos de cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, alternativamente é caracterizado por uma K_D por miostatina de, no máximo, cerca de $4,2 \times 10^{-9}$ M ou $4,0 \times 10^{-9}$ M, de preferência, no máximo cerca de $4,6 \times 10^{-10}$ M, $4,0 \times 10^{-10}$ M ou 2×10^{-10} M e, mais preferivelmente, no máximo cerca de 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 5×10^{-12} M ou $1,4 \times 10^{-12}$ M, e/ou é ainda caracterizado por ter uma IC_{50} menor ou igual a cerca de 40 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM 3 nM, 15 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*.

Ainda mais preferivelmente, um anticorpo da invenção em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência em particular, com mostrado por um SEQ ID Nº deste pedido, é ainda caracterizado por uma IC_{50} em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* que é menor ou igual a cerca de 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM, mais preferivelmente, menor ou igual a cerca de 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*. Ainda mais preferivelmente, a IC_{50} do anticorpo monoclonal antimioestatina em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* é pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor do que a IC_{50} do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* (como descrito no Exemplo 5 neste pedido). Ainda mais preferivelmente, um anticorpo da invenção em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência em particular, com mostrado por um SEQ ID Nº deste pedido, é ainda caracterizado por não se ligar a um peptídeo que consiste nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 de miostatina madura, de preferência, miostatina humana.

25 Expressão de Anticorpo

A presente invenção também é dirigida às linhagens celulares que expressam um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção ou porção deste. A criação e o isolamento de linhagens celulares que produzem um anticorpo monoclonal da invenção podem ser obtidos com o uso de metodologias padronizadas conhecidas na técnica. Linhagens celulares preferidas incluem COS, CHO, SP2/0, NSO e leveduras (disponíveis em depósitos públicos, por exemplo, ATCC, "American Type Culture Collection", Manassas, VA).

Uma ampla variedade de sistemas hospedeiros de expressão pode ser usada para expressar um anticorpo da presente invenção, incluindo sistemas de expressão procarióticos (bacterianos) e eucarióticos (por exemplo, levedura, baculovírus, planta, mamífero e outras células animais, animais transgênicas e células de hibridoma), além de sistemas de expressão de exibição de fago. Um exemplo de um vetor de expressão bacteriano adequado é pUC119, e de um vetor de expressão eucariótico adequado é um vetor pcDNA3.1 modificado com um sistema de seleção DHFR enfraquecido. Outros sistemas de expressão de anticorpos também são conhecidos na técnica e são aqui contemplados.

Um anticorpo da invenção pode ser preparado por expressão recombinante de genes da cadeia leve e pesada de imunoglobulina em uma célula hospedeira. Para expressar um anticorpo de forma recombinante, uma célula hospedeira é transformada, transduzida, infectada ou similar com um ou mais vetores de expressão recombinante que possuem fragmentos de DNA que codificam as cadeias leves e/ou pesadas de imunoglobulina do anticorpo, de forma que as cadeias leves e/ou pesadas são expressas na célula hospedeira. A cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente por diferentes promotores aos quais estão ligados operacionalmente em um vetor ou, alternativamente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente por diferentes promotores aos quais estão ligadas operacionalmente em dois vetores, um que expressa a cadeia pesada e um que expressa a cadeia leve. Opcionalmente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas em células hospedeiras diferentes. De preferência, os anticorpos recombinantes são secretados no meio no qual as células hospedeiras são cultivadas, do qual os anticorpos podem ser recuperados ou purificados. Metodologias padronizadas de DNA recombinante são usadas para obtenção dos genes da cadeia pesada e leve do anticorpo, incorporação desses genes em vetores de expressão recombinante, e introdução dos vetores em células hospedeiras. Essas tecnologias padronizadas de DNA recombinante são descritas, por exemplo, em Sambrook, Fritsch e Maniatis (Eds.), "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", Se-

gunda Edição, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, e outros (Eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates, 1989.

Um DNA isolado que codifica uma região HCVR pode ser convertido em um gene da cadeia pesada de comprimento total ligando-se operacionalmente o DNA que codifica a HCVR a outra molécula de DNA que codifica regiões constantes da cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes da região constante da cadeia pesada humana são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Kabat, e outros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, "U.S. Department of Health e Human Services", Publicação NIH Nº 91-3242 (1991). Fragmentos de DNA que englobam essas regiões podem ser obtidos, por exemplo, por amplificação-padrão por PCR. A região constante da cadeia pesada pode ser de qualquer tipo, (por exemplo, IgG, IgA, IgE, IgM ou IgD), classe (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), ou subclasse de região constante, e qualquer variante alotípica desta, como descrito em Kabat (*supra*). Alternativamente, a porção de ligação de antígeno pode ser um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')₂, Fd, ou um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Para um gene da cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA que codifica a HCVR pode ser ligado operacionalmente a outra molécula de DNA que codifica apenas uma região constante da cadeia pesada CH1.

Um DNA isolado que codifica a região LCVR pode ser convertido em um gene da cadeia leve de comprimento total (além de um gene da cadeia leve de Fab) ligando-se operacionalmente o DNA que codifica a LCVR a outra molécula de DNA que codifica uma região constante da cadeia leve, CL. As seqüências de genes da região constante da cadeia leve humana são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Kabat, *supra*. Os fragmentos de DNA que englobam essas regiões podem ser obtidos por amplificação-padrão por PCR. A região constante da cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA que codificam HCVR e LCVR são ligados operacionalmente a outro fragmento que codifica

um vinculador flexível, por exemplo, que codifica a seqüência de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal forma que as seqüências HCVR e LCVR possam ser expressas como uma proteína contígua de cadeia simples, com as regiões LCVR e HCVR unidas pelo vinculador flexível. Vide, por exemplo, Bird, e outros, *Science* 242: 423-6, 1988; Huston, e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5.879-83, 1988; McCafferty, e outros, *Nature* 348: 552-4, 1990.

Para expressar um anticorpo da invenção, um DNA que codifica uma cadeia leve e/ou pesada parcial ou de comprimento total, obtida da forma descrita acima, é inserido em um vetor de expressão, de tal forma que o gene seja ligado operacionalmente às seqüências de controle de transcrição e de tradução. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados, ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padronizados. Adicionalmente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinalizador que facilita a secreção da cadeia leve e/ou pesada do anticorpo monoclonal antimiostatina por uma célula hospedeira. O gene da cadeia leve e/ou pesada do anticorpo monoclonal antimiostatina pode ser clonado no vetor, de tal forma que o peptídeo sinalizador seja ligado operacionalmente estruturalmente ao amino terminal do gene da cadeia o anticorpo. O peptídeo sinalizador pode ser um peptídeo sinalizador de imunoglobulina ou um peptídeo sinalizador heterólogo.

Além do(s) gene(s) da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo, um vetor de expressão recombinante da invenção possui seqüências reguladoras que controlam a expressão do(s) gene(s) da cadeia do anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "seqüência reguladora" visa incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação), como necessário, que controlam a transcrição ou tradução do(s) gene(s) da cadeia do anticorpo. O design do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências reguladoras, pode depen-

der de fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e o nível de expressão de proteína desejado. Seqüências reguladoras preferidas para expressão em células hospedeiras mamíferas incluem elementos virais que dirigem níveis elevados de expressão protéica em células mamíferas, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio maior de adenovírus (AdMLP)), e vírus do políoma.

Além dos genes da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo e das seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinante da invenção podem possuir seqüências adicionais; como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e um ou mais genes de marcador selecionável. O gene de marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido. Por exemplo, tipicamente o gene de marcador selecionável confere resistência a fármacos, por exemplo, G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes de marcador selecionável preferidos incluem o gene de diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras menos DHFR com seleção/amplificação com metotrexato), o gene *neo* (para seleção com G418) e glutamina sintetase (GS) em uma linhagem celular GS-negativa (por exemplo, NSO) para seleção/amplificação.

Para expressão das cadeias leves e/ou pesadas, o(s) vetor de expressão(s) que codifica as cadeias pesadas e/ou leves é introduzido em uma célula hospedeira por técnicas padronizadas, por exemplo, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com DEAE-dextrana, transdução, infecção e similares. Embora teoricamente seja possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras tanto procarióticas ou eucarióticas, preferem-se células eucarióticas e, principalmente, células hospedeiras mamíferas, pois essas células possuem maior probabilidade de montar e secretar um anticorpo adequadamente dobrado e imunologicamente ativo. Células hospedeiras mamíferas preferidas para a expressão dos anticorpos recombinantes da invenção incluem células de hamster chinês

(células CHO) (incluindo células DHFR-CHO), descritas em Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4.216-20, 1980, usadas com um marcador selecionável DHFR, por exemplo, como descrito em Kaufman e Sharp, *J. Mol. Biol.* 159: 601-21, 1982, células de mieloma NSO, células COS e células SP2/0. Quando vetores de expressão recombinante que codificam genes do anticorpo são introduzidos em células hospedeiras mamíferas, os anticorpos são produzidos por cultivo das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras crescem. Os anticorpos podem ser recuperados da célula hospedeira e/ou do meio de cultura com o uso de métodos padronizados de purificação.

As células hospedeiras também podem ser usadas para produzir porções, ou fragmentos, de anticorpos intactos, por exemplo, fragmentos Fab ou moléculas scFv por técnicas convencionais. Será entendido por aqueles versados na técnica que variações no procedimento acima estão incluídas no escopo da presente invenção. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com DNA que codifica tanto a cadeia leve quanto a cadeia pesada de um anticorpo desta invenção. A tecnologia de DNA recombinante também pode ser usada pra remover uma parte de ou todo o DNA que codifica uma ou ambas as cadeias, leves e pesadas, que não é necessário para a ligação à miostatina. As moléculas expressas por essas moléculas truncadas de DNA também são englobadas pelos anticorpos da invenção.

Em um sistema preferido para a expressão recombinante de um anticorpo da invenção, um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células DHFR-CHO, por exemplo, por transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor de expressão recombinante, os genes da cadeia pesada e leve do anticorpo estão ligados operacionalmente a elementos reguladores do intensificador/promotor (por exemplo, derivados de SV40, CMV, adenovírus e similares, por exemplo, um elemento regulador de

intensificador/promotor AdMLP de CMV ou um elemento regulador de intensificador/promotor AdMLP de SV40) para gerar níveis elevados de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também possui um gene DHFR, que permite a seleção de células CHO que foram transfectadas com o vetor com a utilização de seleção/amplificação com metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias leves e pesadas do anticorpo, e o anticorpo intacto é recuperado do meio de cultura. São usadas técnicas padronizadas de biologia molecular para preparar o vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, selecionar os transformantes, cultivar as células hospedeiras, e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Os anticorpos da invenção, ou porções de ligação de antígeno destes, podem ser expressos em um animal (por exemplo, um camundongo) que seja transgênico para os genes de imunoglobulina humana (vide, por exemplo, Taylor, e outros, *Nucleic Acids Res.* 20: 6.287-95, 1992).

Uma vez expressos, os anticorpos intactos, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras formas de imunoglobulina da presente invenção podem ser purificados de acordo com procedimentos padronizados na técnica, incluindo precipitação com sulfato de amônio, troca iônica, afinidade, fase reversa, cromatografia em coluna por interação hidrofóbica, eletroforese em gel e similares. Imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90%, 92%, 94% ou 96% de homogeneidade são preferidas, e de 98 a 99% ou mais de homogeneidade são as mais preferidas para usos farmacêuticos. Uma vez purificados, parcialmente ou até a homogeneidade desejada, os peptídeos podem então ser usados terapêutica ou profilaticamente, como aqui apresentado.

Anticorpo Quimérico

Como aqui usado, o termo "anticorpo quimérico" inclui imunoglobulinas monovalentes, divalentes ou polivalentes. Um anticorpo quimérico monovalente é um dímero formado por uma cadeia pesada quimérica associada através de pontes dissulfeto a uma cadeia leve quimérica. Um anticorpo quimérico divalente é um tetrâmero formado por dois dímeros de cadeia

pesada-cadeia leve associados através de pelo menos uma ponte dissulfeto.

Uma cadeia pesada quimérica de um anticorpo compreende uma região de ligação de antígeno derivada da cadeia pesada de um anticorpo não humano específico para miostatina, que é ligado operacionalmente a pelo menos uma porção de uma região constante da cadeia pesada humana, ou substancialmente humana (ou de espécies diferentes daquela da qual a região de ligação de antígeno foi derivada), por exemplo, CH1 ou CH2, ou, preferivelmente, a uma região constante da cadeia pesada de comprimento total. Uma cadeia leve quimérica de um anticorpo para uso em seres humanos compreende uma região de ligação de antígeno derivada inteira ou substancialmente da cadeia leve de um anticorpo não humano específico para miostatina, ligada operacionalmente a pelo menos uma porção de uma região constante da cadeia leve (CL) humana, ou substancialmente humana (ou de espécies diferentes daquela da qual a região de ligação de antígeno foi derivada), ou, de preferência, a uma região constante da cadeia leve de comprimento total. Anticorpos, fragmentos ou derivados que possuem cadeias pesadas e cadeias leves quiméricas da mesma especificidade de ligação da região variável ou de especificidade de ligação da região variável diferente também podem ser preparados por associação adequada das cadeias polipeptídicas individuais, de acordo com etapas conhecidas do método.

Com essa abordagem, hospedeiros que expressam cadeias pesadas quiméricas são cultivados separadamente dos hospedeiros que expressam cadeias leves quiméricas, e as cadeias de imunoglobulina são recuperadas separadamente, e depois associadas. Alternativamente, os hospedeiros podem ser co-cultivados, e permite-se que as cadeias se associem espontaneamente no meio de cultura, seguido por recuperação da imunoglobulina montada ou do fragmento. Métodos para a produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 6.284.471, 5.807.715, 4.816.567 e 4.816.397).

Anticorpos Humanizados

De preferência, um anticorpo da invenção a ser utilizado para

fins terapêuticos teria a sequência da estrutura central e a região constante (na medida em que ela exista no anticorpo) derivadas do mamífero no qual seriam usadas como agente terapêutico, de forma a diminuir a possibilidade de que o mamífero gerasse uma resposta imunológica contra o anticorpo terapêutico. Anticorpos humanizados são particularmente interessantes, pois são considerados valiosos para aplicações terapêuticas e para evitar a resposta de anticorpo humano anticamundongo freqüentemente observada com anticorpos de roedores. Adicionalmente, nos anticorpos humanizados, a porção efetora é humana e, portanto, pode interagir melhor com as outras partes do sistema imunológico humano (por exemplo, destruir as células-alvo mais eficazmente por citotoxicidade dependente de complemento ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo). Além disso, anticorpos humanizados injetados podem possuir uma meia-vida mais similar àquela dos anticorpos humanos de ocorrência natural do que, por exemplo, anticorpos murídeos, permitindo, dessa forma, que sejam administradas doses menores e menos freqüentes. O termo "anticorpo humanizado", como aqui usado, refere-se a um anticorpo que compreende porções de anticorpos de origens diferentes, em que pelo menos uma porção é de origem humana. Por exemplo, o anticorpo humanizado pode compreender porções derivadas de um anticorpo de origem não humana com a especificidade exigida, por exemplo, um camundongo, e de um anticorpo de origem humana, unidas quimicamente por técnicas convencionais (por exemplo, sintética), ou preparado como um polipeptídeo contíguo com a utilização de técnicas de engenharia genética.

De preferência, um "anticorpo humanizado" possui CDRs que se originam de um anticorpo não humano (de preferência, um anticorpo monoclonal de camundongo), enquanto a estrutura central e a região constante, na medida em que esteja presente (ou uma porção significativa ou substancial desta, isto é, pelo menos cerca de 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%), são codificadas por informação de sequência de ácidos nucleicos que ocorre na região de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (vide, por exemplo, a base de dados internacional ImMunoGenetics) ou em formas recombinadas ou mutadas desta, sejam os referidos an-

ticorpos produzidos ou não em célula humana. As CDRs de um anticorpo humanizado podem ser otimizadas pelas CDRs de um anticorpo não humano original do qual se originaram para gerar as propriedades desejadas; por exemplo, especificidade, afinidade e capacidade. CDRs otimizadas podem
 5 ter substituições, adições e/ou eliminações de aminoácidos, quando comparadas com as CDRs originais. Por exemplo, as posições de aminoácidos de CDRs que estão sublinhadas e em negrito nas Figuras 6 e 7 são posições que foram otimizadas pelas CDRs originais, como mostrado na Figura 5.

As formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo, murídeos) incluem um anticorpo intacto, um anticorpo substancialmente intacto, uma porção de um anticorpo que compreende um sítio de ligação de antígeno ou uma porção de um anticorpo que compreende um fragmento Fab, um fragmento Fab', F(ab')₂ ou um fragmento Fv de cadeia simples. Anticorpos humanizados contêm preferivelmente o mínimo de seqüências derivadas de imunoglobulinas não humanas. Anticorpos humanizados também podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas CDR importadas ou nas seqüências estruturais.
 10 Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos, ou pelo menos um e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos, ou substancialmente todos, os aminoácidos nas regiões CDR correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana, e todos ou substancialmente todos os aminoácidos nas regiões FR são aqueles de uma seqüência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado otimamente também compreende pelo menos uma porção de uma região constante de
 15 imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana [Jones e outros, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature*, 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Anticorpos humanizados podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* com o uso de métodos de uso rotineiro na técnica (ou, quando for
 20 usado um animal transgênico para seqüências de Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e, dessa forma, as seqüências de aminoácidos da região estrutural das regiões HCVR e LCVR dos anticorpos humanizados recombi-

nantes são seqüências que, embora derivadas daquelas relacionadas às seqüências de HCVR e LCVR de linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório do anticorpo de linhagem germinativa humana *in vivo*. Contempla-se que tais seqüências de aminoácidos das regiões estruturais HCVR e LCVR dos anticorpos humanizados recombinantes são pelo menos 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% ou, principalmente, pelo menos 99% idênticas a uma seqüência de linhagem germinativa humana. De preferência, aqueles resíduos estruturais do anticorpo original (por exemplo, anticorpo murídeo ou, geralmente, o anticorpo do qual o anticorpo humanizado é derivado) que mantêm ou afetam estruturas do sítio de combinação serão mantidos. Esses resíduos podem ser identificados, por exemplo, por cristalografia por raios X do anticorpo original ou fragmento Fab que identifica, dessa forma, a estrutura tridimensional do sítio de ligação de antígeno.

O anticorpo humanizado da presente invenção pode compreender ou ser derivado de uma estrutura central da cadeia leve de linhagem germinativa humana. Em modalidades específicas, a seqüência da cadeia leve da linhagem germinativa é selecionada de seqüências VK humanas que incluem, sem limitação, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 e O8. Em certas modalidades, essa estrutura central da cadeia leve de linhagem germinativa humana é selecionada de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, -V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, -V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 e V5-6. Vide PCT WO 2005/005604 para uma descrição das diferentes seqüências de linhagem germinativa.

Em outras modalidades, o anticorpo humanizado da presente invenção pode compreender ou ser derivado de uma estrutura central da cadeia pesada de linhagem germinativa humana. Em modalidades específicas, essa estrutura central da cadeia pesada de linhagem germinativa hu-

mana é selecionada de VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, 5 VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 e VH7-81. Vide PCT WO 2005/005604 para uma descrição das diferentes seqüências de linhagem germinativa.

Em modalidades específicas, a região variável da cadeia leve e/ou região variável da cadeia pesada compreende uma região estrutural, ou 10 pelo menos uma porção de uma região estrutural (por exemplo, contendo 2 ou 3 sub-regiões, por exemplo, FR2 e FR3). Em certas modalidades, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3 ou FRL4 é totalmente humana. Em outras modalidades, pelo menos FRH1, FRH2, FRH3 ou FRH4 é totalmente humana. Em algumas modalidades, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3 ou FRL4 é uma se- 15 qüência de linhagem germinativa (por exemplo, linhagem germinativa humana) ou compreende seqüências de consensos humanas para a estrutura central em particular. Em outras modalidades, pelo menos FRH1, FRH2, FRH3 ou FRH4 é uma seqüência de linhagem germinativa (por exemplo, linhagem germinativa humana) ou compreende seqüências de consensos 20 humanas para a estrutura central em particular. Em modalidades preferidas, a região estrutural é uma região estrutural humana.

Em geral, os anticorpos humanizados podem ser produzidos obtendo-se seqüências de ácidos nucléicos que codificam a HCVR e LCVR de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo murídeo ou um anticorpo feito 25 por um hibridoma, que se liga a um epítipo de miostatina da invenção, identificando-se as CDRs nas referidas HCVR e LCVR (não humanas), e enxertando-se essas seqüências de ácidos nucléicos que codificam CDR em seqüências de ácidos nucléicos selecionadas que codificam a estrutura central humana. Opcionalmente, uma região CDR pode ser otimizada por mutagê- 30 nese aleatória ou em localizações específicas a fim de substituir um ou mais aminoácidos na CDR por um aminoácido diferente, antes de enxertar a região CDR na região estrutural. Alternativamente, uma região CDR pode ser

otimizada após a inserção na região estrutural humana com o uso de métodos disponíveis para aqueles versados na técnica. De preferência, as seqüências de aminoácidos estruturais humanas são selecionadas de forma que o anticorpo resultante provavelmente seja adequado para administração *in vivo* em seres humanos. Isso pode ser determinado, por exemplo, com base no uso prévio de anticorpos que contêm essa seqüência estrutural humana. De preferência, a seqüência estrutural humana não será, ela própria, significativamente imunogênica.

Alternativamente, as seqüências de aminoácidos das estruturas centrais para o anticorpo a ser humanizado podem ser comparadas com aquelas de seqüências estruturais humanas conhecidas, com as seqüências estruturais humanas a serem usadas para o enxerto de CDR, e selecionadas com base em suas seqüências componentes que são altamente similares com aquelas do anticorpo original, por exemplo, um anticorpo murídeo que se liga à miostatina. Foram isoladas várias seqüências estruturais humanas, e suas seqüências foram relatadas na técnica. Isso aumenta a probabilidade de que o anticorpo humanizado resultante enxertado com CDR, que contém CDRs das CDRs originais (por exemplo, murídeos) ou otimizadas do anticorpo original enxertadas em estruturas centrais humanas selecionadas (e, possivelmente, a região constante humana), retenha substancialmente a estrutura de ligação de antígeno e, dessa forma, a afinidade de ligação do anticorpo original. Para reter um grau significativo de afinidade de ligação de antígeno, as regiões estruturais humanas selecionadas serão, de preferência, aquelas que supostamente sejam adequadas à administração *in vivo*, isto é, não imunogênicas.

Em qualquer um dos métodos, é obtida a seqüência de DNA que codifica as regiões HCVR e LCVR do anticorpo antimioestatina preferivelmente murídeo. Métodos para a clonagem de seqüências de ácidos nucleicos que codificam imunoglobulinas são bem-conhecidos na técnica. Tais métodos, por exemplo, podem envolver a amplificação das seqüências que codificam imunoglobulina a serem clonadas com o uso de iniciadores adequados por reação em cadeia de polimerase (PCR). Iniciadores adequados

para amplificação de seqüências de ácidos nucléicos de imunoglobulinas e, especificamente, seqüências HCVR e LCVR murídeos, foram relatados na literatura. Após essas seqüências codificadoras de imunoglobulinas terem sido clonadas, elas serão seqüenciadas por métodos bem-conhecidos na técnica.

Após a inserção das seqüências codificadoras da CDR nas seqüências codificadoras da estrutura central humana selecionadas, as seqüências de DNA resultantes que codificam as seqüências da região variável pesada e variável leve "humanizadas" são então expressas para produzir um Fv humanizado ou um anticorpo humanizado que se liga à miostatina. As HCVR e LCVR humanizadas podem ser expressas como parte de uma molécula inteira de anticorpo antimioestatina, isto é, como uma proteína de fusão com seqüências do domínio constante humano cujas seqüências codificadoras de DNA foram obtidas a partir de uma biblioteca disponível comercialmente, ou que foram obtidas com o uso, por exemplo, de um dos métodos descritos acima para a obtenção de seqüências de DNA, ou fazem parte da técnica. No entanto, as seqüências de HCVR e LCVR também podem ser expressas na ausência de seqüências constantes para produzir um Fv humanizado antimioestatina. No entanto, a fusão de seqüências constantes humanas sobre a região variável é potencialmente desejável, pois o anticorpo humanizado antimioestatina resultante pode possuir funções efetoras humanas.

Métodos para a síntese de DNA que codifica uma proteína de uma seqüência conhecida são bem-conhecidos na técnica. Com o uso de tais métodos, são sintetizadas seqüências de DNA que codificam as seqüências humanizadas de HCVR e LCVR em questão (com ou sem regiões constantes), e depois elas são expressas em um sistema de vetor adequado à expressão de anticorpos recombinantes. Isso pode ser obtido em qualquer sistema de vetor que permita que as seqüências de HCVR e LCVR humanizadas em questão sejam expressas como uma proteína de fusão com seqüência do domínio constante humano e se associem para produzir os anticorpos funcionais (ligação de antígeno) ou fragmentos de anticorpo.

Seqüências do domínio constante humano são bem-conhecidas na técnica, e foram relatadas na literatura. Seqüências preferidas da cadeia leve constante humana incluem as seqüências da cadeia leve constante kappa e lambda. Seqüências preferidas da cadeia pesada constante humana incluem IgG₁ humana, IgG₂ humana, IgG₃ humana, IgG₄ humana e versões mutadas destas que forneçam a função efetora alterada, por exemplo, aumento da meia-vida *in vivo*, ligação ao receptor Fc reduzida, perfil de de-saminação alterado, e similares.

Se presentes, regiões estruturais humanas são, de preferência, derivadas de uma região variável de um anticorpo humano que possui similaridade de seqüência com a região análoga ou equivalente do doador da região de ligação de antígeno (isto é, o anticorpo original). Outras fontes de regiões estruturais para porções de origem humana de um anticorpo humanizado incluem seqüências variáveis de consenso humanas (vide, por exemplo, Kettleborough, C.A. e outros *Protein Engineering* 4: 773-7-83 (1991); Carter e outros, WO 94/04679). Por exemplo, a seqüência do anticorpo ou a região variável usada para se obter a porção não humana pode ser comparada com seqüências humanas, como descrito em Kabat e outros "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). Em uma modalidade particularmente preferida, as regiões estruturais de uma cadeia de anticorpo humanizado são derivadas de uma região variável humana que possui pelo menos cerca de 60% de identidade de seqüência global, de preferência, pelo menos cerca de 70% de identidade de seqüência global e, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 85% de identidade de seqüência global, com a região variável de um doador não-humano. Uma porção humana pode ser derivada de um anticorpo humano que possui pelo menos cerca de 65% de identidade de seqüências e, preferivelmente, pelo menos cerca de 70% de identidade de seqüências, dentro da porção específica (por exemplo, FR) que está sendo usada, quando comparada com a porção equivalente (por exemplo, FR) do doador não-humano.

Referências adicionais que descrevem métodos envolvidos na

humanização de um anticorpo de camundongo que podem ser usadas são, por exemplo, Queen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2.869, 1991; Patente U.S. Nº 5.693.761; Patente U.S. Nº 4.816.397; Patente U.S. Nº 5.225.539; programas de computador ABMOD e ENCAD, como descritos em
 5 Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620, 1983; a humanização pode ser essencialmente realizada de acordo com o método de Winter e outros [Jones e outros, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen e outros, *Science*, 239: 1.534-1.536 (1988)].

Anticorpos Humanos

10 Como alternativa à humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. Anticorpos humanos podem ser produzidos com o uso de várias metodologias conhecidas na técnica, incluindo bibliotecas de exibição de fago (Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). As técnicas de Cole e outros e Boerner e outros
 15 também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole e outros, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner e outros, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)). Da mesma forma, anticorpos humanos podem ser feitos por introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, ca-
 20 mundongos, nos quais os genes endógenos de imunoglobulina foram parcial ou completamente inativados. Mediante imunização com um antígeno que compreende um epitopo imunogênico da invenção, é obtido um repertório inteiro de produção de anticorpo humano, que se parece intimamente com
 25 aquele observado em seres humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo de genes, montagem e repertório de anticorpo. Essa abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.589.369, 5.591.669, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, e nas seguintes publicações científicas: Marks e outros, *BioTechnology* 10: 779-783, 1992; Lonberg e outros, *Nature* 368: 856-859, 1994; Morrison, *Nature*
 30 368: 812-13, 1994; Fishwild e outros, *Nature Biotechnology* 14: 845-51, 1996; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Innmunol.* 13: 65-93 (1995) e Jobkobovits e outros, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 90: 2.551, 1.993.

Genes de imunoglobulina humana introduzidos no camundongo criando, dessa forma, camundongos transgênicos capazes de responder aos antígenos com anticorpos que possuem seqüências humanas também são descritos em Bruggemann e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6.709-6713 (1989). Há várias estratégias para a geração de mamíferos que produzem anticorpos humanos. Em particular, há a abordagem de "minilocus", na qual é mimetizado um locus de Ig exógeno através da inclusão de pedaços (genes individuais) do locus de Ig (vide, por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650 e 5.814.318, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215), introdução YAC de fragmentos grandes e substancialmente da linha germinativa dos loci de Ig [vide Mendez e outros *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Green e Jakobovits *J. Exp. Med.* 188: 483-495 (1998)], e a introdução dos loci inteiros, ou substancialmente inteiros, através do uso da fusão de microcélulas (vide o Pedido de Patente Européia N^o EP 0 843 961 A1).

Pode ser utilizado qualquer camundongo transgênico capaz de responder à imunização com anticorpos que possuem seqüências humanas para a produção de um anticorpo antimiostatina da invenção, quando se utilizam os métodos disponíveis por aqueles versados na técnica, por exemplo, quando esse camundongo é imunizado com um polipeptídeo que compreende epitopo imunogênico da invenção.

Usos

Os anticorpos da presente invenção são úteis em aplicações terapêuticas, profiláticas e de pesquisa, como aqui descrito. Um anticorpo da invenção pode ser usado para diagnosticar um distúrbio ou uma doença associada à expressão de miostatina humana. De forma similar, o anticorpo da invenção pode ser usado em um ensaio para monitorar os níveis de miostatina em um indivíduo tratado para uma condição associada à miostatina. Aplicações de pesquisa incluem métodos que utilizam o anticorpo da invenção e um marcador para detectar miostatina em uma amostra, por exemplo, em um fluido corpóreo humano, ou em uma célula ou extrato de tecido. Os anti-

corpos da invenção podem ser usados com ou sem modificação, e são marcados por adesão covalente ou não covalente de uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, direta ou indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo como, por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente, por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, por exemplo, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de raiz forte. Qualquer método conhecido na técnica para conjugar separadamente o anticorpo à porção detectável pode ser empregado, incluindo aqueles métodos descritos por Hunter, e outros, *Nature* 144: 945, 1962; David, e outros, *Biochemistry* 13: 1.014, 1974; Pain, e outros, *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; e Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.* 30: 407, 1982.

São conhecidos na técnica vários protocolos convencionais para a medida de miostatina, incluindo, por exemplo, ELISAs, RIAs e FACS, e eles fornecem uma base para o diagnóstico de níveis alterados ou anormais da expressão de miostatina. Valores normais ou padronizados de expressão são estabelecidos com o uso de qualquer metodologia conhecida na técnica, por exemplo, por combinação de uma amostra que compreende um polipeptídeo de miostatina com, por exemplo, anticorpos, sob condições adequadas para formar um complexo antígeno:anticorpo. O anticorpo é marcado direta ou indiretamente com uma substância detectável para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não ligado. Substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de um material radioativo incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H (vide, por exemplo, Zola, "Mo-

noclonal Antibodies: A Manual of Techniques", CRC Press, Inc. (1987)). A quantidade de um complexo-padrão formado é quantificada por vários métodos como, por exemplo, meios fotométricos. As quantidades de polipeptídeo de miostatina expressas nas amostras são então comparadas com os valores padronizados.

Por questão de conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser fornecido em um kit, uma combinação embalada de reagentes em quantidades predeterminadas, com instruções para a realização do ensaio diagnóstico. Quando o anticorpo for marcado com uma enzima, o kit incluirá substratos e co-fatores necessários pela enzima (por exemplo, um precursor de substrato que fornece o cromóforo ou fluoróforo detectável). Além disso, podem ser incluídos outros aditivos, por exemplo, estabilizantes, tampões (por exemplo, um tampão de bloqueio ou um tampão de lise) e similares. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas amplamente para a geração de concentrações em solução dos reagentes que substancialmente otimizem a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos como pós secos, normalmente liofilizados, que incluem excipientes, os quais, sob dissolução, fornecerão uma solução reagente que possui a concentração adequada.

20 Usos Terapêuticos do Anticorpo

A miostatina tem um papel no desenvolvimento muscular e em diversos distúrbios ou doenças relacionadas. Em adultos, o mRNA de miostatina é detectado primariamente no músculo esquelético, embora concentrações menores também sejam encontradas no tecido adiposo e no tecido cardíaco (Sharma, M., e outros, *J. Cell Physiol.* 180: 1, 1999). Camundongos *knock-out* para miostatina possuem uma massa muscular duas a três vezes maior do que seus equivalentes do tipo selvagem. O aumento da massa muscular é resultado da hipertrofia e hiperplasia das fibras (McPherron, A., e outros *Nature* 387: 83-90, 1997 e Zhu, X. e outros, *FEBS Letters* 474: 71). Além disso, os camundongos *knock-out* para miostatina acumulam menos gordura do que seus equivalentes do tipo selvagem, mas, fora isso, parecem normais e saudáveis. Também foi demonstrado recentemente que a miosta-

tina é um regulador importante da adipogênese (Rebbapragada, A., e outros, *Mol. and Cell. Bio.* 23: 7.230-7.242, 2003). Adicionalmente, a estrutura e o conteúdo ósseos foram recentemente estudados em camundongos deficientes em miostatina (Hamrick M.W., e outros, *J. Orthopaedic Research* 21: 1.025, 2003; Hamrick, M.W., e outros, *Calcif. Tissue Int.* 71: 63, 2002).

Portanto, uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo monoclonal antimioestatina da invenção pode ser usada para aumentar a massa muscular, aumentar a densidade óssea, diminuir a destruição muscular, ou pode ser útil para o tratamento ou prevenção de condições nas quais a presença de miostatina causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis, ou a diminuição dos níveis de miostatina tem um benefício terapêutico em mamíferos, de preferência, seres humanos, incluindo, sem limitação, destruição muscular, lesão muscular, cirurgia, reparo de músculos danificados, fraqueza, sarcopenia relacionada à idade, atrofia por desuso, osteoporose, osteoartrite, crescimento e reparo de ligamentos, obesidade, supressão de acúmulo corporal de gordura, obesidade, distrofia muscular de qualquer tipo, miopatia do atendimento intensivo, miopatia alcoólica, caquexia (por exemplo, relacionada ao câncer ou induzida por HIV; ou resultante de DPOC, doença pulmonar crônica, recuperação de sépsis, insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência ou doença cardíaca), síndrome metabólica, destruição muscular pós-queimadura, e diabetes do Tipo II. A atrofia por desuso pode ser produzida por várias causas ou incidentes, incluindo qualquer distúrbio ou doença ou estado que leve à imobilidade ou desuso ou permanência prolongada no leito, incluindo, sem limitação, transplante de órgão sólido, substituição de articulação, acidente vascular cerebral, lesão da medula vertebral, recuperação de queimadura grave, hemodiálise sedentária crônica, recuperação pós-séptica e exposição à microgravidade. Como a miostatina é altamente conservada em termos de sequência e função através de espécies, os anticorpos da invenção podem ser usados para aumentar a massa muscular, aumentar a densidade óssea, ou tratar ou evitar condições em mamíferos não humanos ou espécies aviárias [por exemplo, animais domésticos (por exemplo, caninos e felinos), animais de

esportes (por exemplo, eqüinos), animais que servem de fontes de alimentos (por exemplo, bovinos, suínos e ovinos), espécies aviárias (por exemplo, galinha, peru, outras aves de caça ou aves domésticas)] nos quais a presença de miostatina causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis, ou nos quais a diminuição dos níveis de miostatina tem um benefício terapêutico.

É aqui contemplado o uso de um anticorpo monoclonal antimiosstatina da presente invenção para o tratamento ou a prevenção de pelo menos um dos distúrbios mencionados anteriormente nos quais a atividade de miostatina é prejudicial, ou que se beneficiam dos níveis diminuídos de miostatina bioativa. Adicionalmente, é contemplado o uso de um anticorpo monoclonal antimiosstatina da presente invenção para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de pelo menos um dos distúrbios mencionados anteriormente.

Como aqui usado, os termos "tratamento", "que trata", e similares, referem-se à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de evitar completa ou parcialmente uma doença ou um sintoma desta, e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. "Tratamento", como aqui usado, inclui a administração de um composto da presente invenção para tratamento de uma doença ou condição em um mamífero, particularmente em um ser humano, e inclui: (a) prevenção da ocorrência da doença em um indivíduo que pode estar predisposto à doença, mas que ainda não teve o diagnóstico confirmado; (b) a inibição da doença, isto é, interromper seu desenvolvimento; e (c) alívio da doença, isto é, causar a regressão da doença ou do distúrbio, ou alívio dos sintomas ou complicações desta. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, pode ser administrado um único bolus, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo, ou a dose pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente, como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Composição Farmacêutica

Um anticorpo da invenção pode ser incorporado em composições farmacêuticas adequadas à administração a um indivíduo. Os compostos da invenção podem ser administrados isoladamente ou em combinação com um veículo, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável, em dose única ou em múltiplas doses. As composições farmacêuticas para administração são projetadas para serem adequadas ao modo de administração selecionado, e diluentes, veículos e/ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como agentes dispersantes, tampões, tensoativos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidade, agentes estabilizantes, e similares, são usados como for adequado. Tais composições são projetadas de acordo com técnicas convencionais como, por exemplo, em Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 19ª Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, que fornece um compêndio sobre técnicas de formulação geralmente conhecidas por aqueles habilitados na técnica.

Uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo monoclonal antimiestatina da presente invenção pode ser administrada a um indivíduo em risco de adquirir ou que exibe patologias aqui descritas, com o uso de técnicas de administração padronizadas que incluem a administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual ou por supositórios.

De preferência, uma composição farmacêutica da invenção é uma "quantidade terapêuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo pode variar de acordo com fatores como o estado de doença, a idade, o sexo e o peso do indivíduo, e a habilidade do anticorpo ou porção do anticorpo para despertar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz também é aquela na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anti-

corpo são compensados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, desde que uma dose profilática seja usada nos indivíduos antes ou em um estágio inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz é pelo menos a dose mínima, porém menor do que a dose tóxica, de um agente ativo que é necessária para gerar benefício terapêutico a um indivíduo. Colocado de outra forma, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo da invenção é uma quantidade que, em mamíferos, de preferência, humanos, aumenta a massa muscular, aumenta a densidade óssea, ou trata condições nas quais a presença de miostatina causa ou contribui para os efeitos patológicos indesejáveis, em que a diminuição dos níveis de miostatina resulta em um efeito terapêutico benéfico em um mamífero, de preferência, um ser humano, incluindo, sem limitação, destruição muscular, lesão muscular, cirurgia fraqueza, sarcopenia relacionada à idade, atrofia por desuso, osteoporose, osteoartrite, crescimento e reparo de ligamentos, obesidade, supressão de acúmulo corporal de gordura, distrofia muscular de qualquer tipo, miopatia do atendimento intensivo, caquexia (por exemplo, relacionada ao câncer ou induzida por HIV, ou resultante de DPOC, insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência ou doença cardíaca), síndrome metabólica e diabetes do Tipo II. A atrofia por desuso pode resultar de várias causas ou incidentes, incluindo qualquer distúrbio ou doença ou estado que leve à imobilização ou desuso ou permanência no leito prolongada, incluindo, sem limitação, transplante de órgão sólido, substituição de articulação, acidente vascular cerebral, lesão da medula vertebral, recuperação de queimadura grave, hemodiálise sedentária crônica, pós-sépsis, recuperação, e exposição à microgravidade.

A via de administração de um anticorpo da presente invenção pode ser oral, parenteral, por inalação ou tópica. De preferência, os anticorpos da invenção podem ser incorporados em uma composição farmacêutica

adequada à administração parenteral.

O termo "parenteral", como aqui usado, inclui a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal ou intraperitoneal. Prefere-se a liberação sistêmica periférica por injeção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea. Veículos adequados para essas injeções são conhecidos na técnica.

A composição farmacêutica tipicamente deve ser estéril e estável sob as condições de fabricação e estocagem no recipiente fornecido, incluindo, por exemplo, um frasco ou seringa lacrada. Portanto, as composições farmacêuticas podem ser esterilizadas por filtração após a produção da formulação, ou de algum outro modo tornadas microbiologicamente aceitáveis. Uma composição típica para infusão intravenosa poderia ter um volume de até 250-1.000 ml de líquido, por exemplo, solução de Ringer estéril, soro fisiológico, solução de dextrose e solução de Hank, e uma dose terapêuticamente eficaz (por exemplo, 1 a 100 mg/ml, ou mais) de concentração do anticorpo. A dose pode variar, dependendo do tipo e da gravidade da doença. Como é bem-conhecido na técnica médica, as dosagens para qualquer indivíduo dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, a área de superfície corporal, a idade, o composto específico a ser administrado, o sexo, o tempo e a via de administração, saúde geral, e outros fármacos que estiverem sendo administrados concomitantemente. Uma dose típica pode ser, por exemplo, na faixa de 0,001 a 1000 µg; no entanto, doses abaixo ou acima dessa faixa exemplar são previstas, especialmente considerando-se os fatores mencionados anteriormente. O regime de dosagem parenteral diária pode ser de cerca de 0,1 µg/kg a cerca de 100 mg/kg do peso corporal total, de preferência, de cerca de 0,3 µg/kg a cerca de 10 mg/kg e, mais preferivelmente, de cerca de 1 µg/kg a 1 mg/kg, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,5 a 10 mg/kg do peso corporal por dia. O progresso pode ser monitorado por avaliações periódicas. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não são aqui ex-

cluídos. A dosagem desejada pode ser liberada por uma administração em bólus única, por várias administrações em bólus, ou por administração por infusão contínua do anticorpo, dependendo do padrão de queda farmacocinética que o profissional deseja obter.

- 5 Essas quantidades de anticorpo sugeridas estão sujeitas, em grande parte, ao acompanhamento terapêutico. O fator fundamental na seleção de uma dose e um esquema apropriados é o resultado obtido. Fatores que devem ser levados em consideração nesse contexto incluem o distúrbio específico tratado, o mamífero específico tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa do distúrbio, o local de liberação do anticorpo, o tipo de anticorpo em particular, o método de administração, o esquema de administração, e outros fatores conhecidos pelos profissionais médicos.

- 10 Os agentes terapêuticos da invenção podem ser congelados ou liofilizados para estocagem, e reconstituídos em um veículo estéril adequado antes do uso. A liofilização e a reconstituição podem levar a graus variáveis de perda da atividade do anticorpo. As dosagens podem ser ajustadas para compensar essa perda. Geralmente, prefere-se um pH entre 6 e 8.

Produtos Manufaturados

- 20 Em outra modalidade da invenção, é fornecido um produto manufaturado contendo materiais úteis para o tratamento ou a prevenção dos distúrbios ou condições descritos acima. O produto manufaturado compreende um recipiente e um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringa e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados por vários materiais, por exemplo, vidro ou plástico. O recipiente
- 25 abriga uma composição da invenção que é eficaz para evitar ou tratar o distúrbio ou a condição, e pode ser uma via de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui uma rolha que pode ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é um anticorpo antimiostatina da
- 30 invenção. O rótulo no recipiente, ou a ele associado, indica que a composição é usada para o tratamento da condição de escolha. O produto manufaturado pode ainda compreender um segundo recipiente que compreende um

tampão farmacêuticamente aceitável, por exemplo, soro fisiológico tampoado com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções para uso.

Os exemplos a seguir são oferecidos somente para fins ilustrativos, e não visam a limitar o escopo da presente invenção de forma alguma.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Ensaios ELISA

10 A. Placas revestidas com miostatina e GDF-11

Os Fabs antimiostatina quiméricos de camundongo/humanos da presente invenção são testados em um ensaio ELISA, no qual é medida a ligação do Fab à miostatina madura (forma dimérica) revestida em várias concentrações em uma placa de 96 cavidades. A ligação dos Fabs a GDF-11 também é testada.

Cada cavidade de duas placas de 96 cavidades é revestida com 50 µl de miostatina humana recombinante (R&D Systems, sem veículo, ressuspensa primeiro em 4 mM de HCl e depois revestida a 1 µg/ml em tampão de carbonato, pH 9,6) ou 50 µl de GDF-11 recombinante humano (Peprotech, Inc., Cat. # 120-11, sem veículo, ressuspensa primeiro em 4 mM de HCl e depois revestida a 1 µg/ml em tampão de carbonato, pH 9,6). As placas são incubadas a 4°C de um dia para o outro. As cavidades são aspiradas e lavadas duas vezes com PBST (PBS + Tween-20 0,1%). As placas são bloqueadas com 200 µl de tampão de bloqueio por cavidade (BSA 1% em PBST por 1 hora).

Os Fabs dos extratos periplasmáticos a serem testados são diluídos serialmente em PBST. Cinquenta microlitros de cada solução de Fab são adicionados às colunas da placa revestida com GDF-8 e GDF-11. As placas são incubadas por uma hora em temperatura ambiente. As cavidades são então lavadas 3 vezes com PBST.

Anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (50 µl de AP kappa de cabra anti-camundongo (Southern Biotech), diluído a 1:1.000

em PBST) é acrescentado a cada cavidade, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. As cavidades são então lavadas 3 vezes com PBST. Cinquenta microlitros de substrato cromogênico (AMP/PMP) são adicionados a cada cavidade, e permite-se que se desenvolvam em temperatura ambiente. A absorbância das cavidades é lida em OD de 560 nm. Para cada Fab, é obtida uma curva de titulação em uma OD relativa no ponto médio da curva de Fab de referência relatada.

Esses dados demonstram que todos os Fabs testados se ligam à miostatina madura humana ligada à placa com reatividade cruzada a GDF-11.

B. Captura de Fab por ELISA

Uma placa de 96 cavidades é revestida com 50 µl de anticorpo kappa de cabra anti-humano a 2 µg por ml em tampão de carbonato. As placas são incubadas a 4°C de um dia para o outro. As cavidades são aspiradas e lavadas duas vezes com PBST (PBS + Tween-20 0,1%). As placas são bloqueadas com 200 µl de tampão de bloqueio por cavidade (BSA 1% em PBST por uma hora). Os Fabs dos extratos periplasmáticos a serem testados são capturados em colunas nas placas por duas horas a 37°C. Após lavagem 3 vezes com PBST, 50 µl de diluições seriais de duas vezes de miostatina biotinizada (de 100 nM a 780 pM) são adicionados a cada coluna de Fabs capturados, e incubados por uma hora a 37°C. A placa é então lavada com PBST, e incubada com PBST a 37°C por 1-3 horas.

Neutravidina conjugada à fosfatase alcalina (Pierce, diluída a 1:1.000 em PBST) é adicionada a cada cavidade e incubada por 2 minutos em temperatura ambiente. As cavidades são então lavadas 3 vezes com PBST. Cinquenta µl de substrato cromogênico (AMP/PMP) são adicionados a cada cavidade, e permite-se que se desenvolvam em temperatura ambiente. A absorbância das cavidades é lida em uma OD de 560 nm, e a OD relativa é comparada com a da OD máxima relatada para o Fab de referência.

Todos os Fabs da invenção testados se ligaram em miostatina madura humana solúvel.

Exemplo 2 Ensaio de Neutralização de Miostatina

Explantos ectodérmicos são removidos de embriões de *Xenopus* de blástula em estágio 8-9 por procedimentos padronizados, e cultivados em 0,5X MBS (1X MBS: 88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 0,7 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, 5 mM de HEPES, 2,5 mM de NaHCO₃, gentamicina 1:1.000 v/v, albumina sérica bovina 0,1%), com a adição de fator de crescimento (GDF-8 ou GDF-11) mais ou indicado, por 18 horas a 18°C, quando então os embriões de controle alcançam o estágio inicial de nêurula (estágio 15-16). Os explantes são fotografados, e o comprimento de cada explante é medido com o uso de um algoritmo de análise de imagens projetado para quantificação de capuz animal. Os explantes não tratados com fator de crescimento ou Fab (controles) se arredondam formando bolas de epiderme. A miostatina e o GDF-11 induzem mesoderma nesses explantes ectodérmicos, o que faz com que os explantes se alonguem e formem estruturas em forma de halteres. Anticorpos ou Fabs, quando testados quanto à atividade neutralizante, são adicionados ao meio de cultura que contém miostatina por toda a duração do período de cultura, e sua habilidade para inibir os movimentos alongamento induzidos por fator de crescimento é avaliada. Acrescenta-se miostatina aos explantes a 25 ng/ml. Os anticorpos ou Fabs a serem testados são adicionados a 20 µg/ml. Um Fab gerado para um antígeno irrelevante é usado como controle. Um anticorpo monoclonal anti-GDF-8 de camundongo disponível comercialmente pode ser testado como controle; esse anticorpo é produzido em cabras imunizadas com GDF-8 de camundongo purificado, e foi demonstrado pelo fabricante que ele neutraliza o alongamento dos capuzes animais de *Xenopus* despertado por 25 ng/ml de GDF-8 murídeo, quando presente em aproximadamente 10-20 µg/ml (R&D Systems Cat. # MAB788).

O programa ImagePro (versão 4.5.1.22, de Media Cybernetics) é usado para o processamento das imagens.

É criada uma macro para automatizar o processamento das imagens. A macro processa a imagem e registra o comprimento em unidades de bits. Podem ser usados métodos alternativos de medição, como é conhe-

cido na técnica. Contempla-se que os anticorpos da invenção neutralizam a atividade de GDF-8 no ensaio de capuz animal.

Exemplo 3: Medida da Afinidade de Fabs

A afinidade (K_D) e as taxas de k_{on} e k_{off} dos Fabs antimiotatina da presente invenção são medidas com o uso de um instrumento BIAcore® 2000 contendo um chip sensor CM4. O BIAcore® utiliza as propriedades ópticas da ressonância de plasmônio de superfície para detectar as alterações na concentração de proteína de moléculas de interação dentro de uma matriz do biossensor de dextrana. Exceto quando observado, todos os reagentes e materiais são adquiridos de BIAcore® AB (Upsala, Suécia). Todas as medidas são realizadas a 25°C. As amostras contendo Fabs são dissolvidas em tampão HBS-EP (150 mM de cloreto de sódio, 3 mM de EDTA, tensoativo P-20 0,05% (p/v), e 10 mM HEPES, pH 7,4). Miotatina ou GDF-11 (R&D Systems) é imobilizada sobre células de fluxo de um chip CM4 com a utilização de química de acoplamento de amina. As células de fluxo (1-4) são ativadas com uma mistura 1:1 de 0,1 M de N-hidroxissuccinimida e 0,1 M de 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida em uma taxa de fluxo de 20 µl/min. Miotatina ou GDF-11 (2,5 µg/ml em 10 mM de acetato de sódio, pH 4,5) é injetada manualmente sobre as células de fluxo individuais, em uma taxa de fluxo de 10 µl/min. A densidade da superfície é monitorada até que cada célula de fluxo atinja uma densidade de superfície de ~150 unidades de resposta (RU). As superfícies são bloqueadas com uma injeção de 50 µl de 1 M de etanolamina-HCl, pH 8,5 (10 µl/min). Para assegurar a remoção completa de qualquer miostatina ou GDF-11 ligada de forma não covalente, 15 µl de 10 mM de glicina, pH 1,5, são injetados duas vezes. O tampão de processamento usado para os experimentos cinéticos continha 10 mM de HEPES, pH 7,4, 150 mM de NaCl, P₂O 0,005%.

A coleta dos dados de ligação cinética é realizada na taxa de fluxo máxima (100 µl/min). Cada ciclo de análise consiste em: (i) injeção de 250 µl de um Fab (a concentração varia de 50 nM a 0,4 nM em incrementos de diluição de duas vezes) sobre todas as 4 células de fluxo, com a célula de fluxo 1 como a célula de fluxo de referência, (ii) dissociação de 20 minutos

- (fluxo de tampão), (iii) regeneração da superfície de GDF-8 ou GDF-11 com duas injeções de 15 µl de 10 mM de glicina, pH 1,5, (iv) uma injeção de controle de 15 µl de tampão de processamento, e (v) um tempo de estabilização de 2 minutos, antes do início do ciclo seguinte. O sinal é monitorado como
- 5 célula de fluxo 2 menos célula de fluxo 1, célula de fluxo 3 menos célula de fluxo 1, e célula de fluxo 4 menos célula de fluxo 1. As amostras e um controle de tampão são injetados em duplicata em uma ordem aleatória. Os dados são processados usando o programa de computador SCRUBBER ("Center for Biomolecular Interaction Analysis", Universidade de Utah). As
- 10 taxas de associação e dissociação para cada ciclo são determinadas ajustando-se os dados do biossensor usando um modelo de associação simples com a utilização de ClampXP ("Center for Biomolecular Interaction Analysis", Universidade de Utah) para extrair as constantes da taxa k_{on} e k_{off} ; a constante de equilíbrio de ligação, K_d , é calculada com o uso do relacionamento
- 15 $K_d = k_{off}/k_{on}$. Os Fabs 41-1 e 412-6, quando medidos no ensaio acima, possuem afinidades para GDF-8 de 4,16 nM ($4,16 \times 10^{-9}$ M) e 0,46 nM ($4,6 \times 10^{-10}$ M), respectivamente, e tiveram afinidades para GDF-11 de 8,96 nM e 0,81 nM, respectivamente; a especificidade relativa para ambos os Fabs foi de aproximadamente uma preferência de duas vezes por GDF-8 em relação a
- 20 GDF-11. (Tabela 2)

Tabela 2

Fab	GDF-8			GDF-11		
	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-6}$)	k_{off} (sec^{-1}) ($\times 10^3$)	K_d (nM) calc.	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-6}$)	k_{off} (sec^{-1}) ($\times 10^3$)	K_d (nM) calc.
41-1	1,16	4,82	4,16	1,04	9,32	8,96
412-6	3,59	1,66	0,46	5,09	4,10	0,81

Exemplo 4: Medida da Afinidade de Mabs

- As medidas da afinidade de ligação para anticorpos monoclonais de comprimento total da invenção são determinadas com o uso de um
- 25 ensaio Sapidyn KINEXA. Glóbulos de sefarose de fluxo rápido ativados por NHS (GE Healthcare) são pré-revestidos com um anticorpo da invenção (50 µg de anticorpo antimiotatina por ml de glóbulos), e bloqueados com 10

mg/ml de BSA em 1 M de Tris-HCl, pH 8,0. A seguir, 2 pM, 4 pM, 40 pM de um anticorpo da invenção (por exemplo, 3-74/C1E4) são incubados com várias concentrações (por exemplo, 2,4 pM a 10 nM, diluições seriais) de miostatina em tampão de processamento (PBS, Tween-20 0,005% (v/v) e 1 mg/ml de ovalbumina) por 10 horas em temperatura ambiente. Para determinar o anticorpo livre presente no equilíbrio, cada amostra é passada através dos glóbulos revestidos com miostatina. A quantidade de anticorpo ligado aos glóbulos é então quantificada passando-se uma solução de anticorpo Fc de cabra anti-humano marcado com fluorescência (Cy5) (Jackson Immuno Research) diluída a 1:4.000 em tampão de processamento sobre os glóbulos. O sinal de fluorescência medido é proporcional à concentração de anticorpo livre no equilíbrio. Cada concentração de miostatina é medida em duplicata. A constante de dissociação em equilíbrio (K_D) é obtida a partir de uma regressão não linear das curvas de competição usando um modelo de ligação *one-site* homogêneo, de múltiplas curvas (programa KINEXA).

A constante da taxa de associação (k_{on}) para a ligação de GDF-8 também é determinada com o uso de um ensaio Sapidyne KINEXA. O anticorpo de 2 pM é misturado com 20 pM de GDF-8 com a utilização das mesmas condições descritas acima. Por várias vezes, as amostras são sondadas quanto ao anticorpo livre com o uso das condições descritas acima para a ligação em equilíbrio, e depois a dependência de tempo resultante é ajustada com o uso do programa KINEXA para determinar a taxa de associação (k_{on}). A constante da taxa de dissociação (k_{off}) é calculada com o uso da expressão $k_{off} = K_D \times k_{on}$. O anticorpo monoclonal de comprimento total 3-74/C1E4₇₂ (ligado operacionalmente a uma região Fc de IgG4) foi medido usando o ensaio descrito, e os resultados obtidos são listados abaixo na Tabela 3.

Tabela 3

Mab	K_D , pM (CI 95%)	k_{on} , $M^{-1} s^{-1}$ (CI 95%)	k_{off} , s^{-1} , calculado
3-74/C1E4	1,39 (0,20-3,58)	$1,49 \times 10^6$ ($1,39-1,58 \times 10^6$)	$2,08 \times 10^{-6}$

Exemplo 5: Ensaio Repórter de Miostatina/SBE

Neste ensaio repórter, um plasmídeo que codifica um gene re-

pórtter, isto é, gene luciferase, abaixo de um elemento de ligação SMAD ("SBE"), mais especificamente (CAGA)₁₂, expressa a proteína de luciferase quando uma molécula como, por exemplo, miostatina, GDF-11 ou outro membro da superfamília do TGF- β , se liga a seu próprio receptor, desencadeando, dessa forma, a sinalização SMAD que resulta em um complexo SMAD fosforilado que é capaz de ligação ao SBE. A sequência CAGA foi relatada previamente como sendo uma sequência TGF- β responsiva dentro do promotor do gene PAI-1 induzido por TGF- β (Denner e outros, *EMBO J.*, 17: 3.091-3.100, 1998). A quantidade de miostatina ativa exposta às células é diretamente proporcional à quantidade da enzima luciferase produzida, a qual é diretamente proporcional à quantidade de luz produzida e mensurável. A presença de um inibidor (por exemplo, um anticorpo que se liga à miostatina) reduz a quantidade de miostatina capaz de ativar o SBE, o que, em última análise, resulta em uma produção reduzida de luz. Este ensaio também é descrito na Publicação Internacional Número WO 2004/037861, aqui incorporada.

Contempla-se que um Ensaio Repórter de Miostatina/SBE não se limite às condições exatas aqui descritas; outros tipos de células podem ser usados, por exemplo, células 293HEK (ATCC) ou A204 de rabdomiossarcoma (vide, por exemplo, Whittemore, e outros *BBRC*, 200: 965-7.1, 2003); outros tipos de repórteres podem ser usados, por exemplo, CAT, β -gal, GFP, e podem ser usadas outras condições de crescimento para as células e outras condições de ensaio, incluindo quantidades variáveis de miostatina na reação. Aqueles habilitados na técnica serão capazes de discernir se um ensaio se enquadra no escopo de um ensaio repórter de miostatina/SBE, pois ele teria um vetor que compreende um elemento SBE acima de um gene repórter introduzido em uma célula hospedeira, em que o elemento SBE usado é responsivo ao SMAD produzido em resposta à ligação de miostatina ao receptor de miostatina. R.S. Thies, e outros, *Growth Factors*, 18: 251-259, 2001, descrevem um ensaio similar, enquanto Wittemore, L. e outros, *BBRC*, 300: 965-971, 2003 descrevem a resposta do elemento SBE ao SMAD produzido em resposta à ligação de miostatina ao seu receptor.

Neste ensaio, células 293E (Edge Biosystems) em um frasco T-75 crescem em meio DMEM/F12 (1:1) (Gibco 10565-042) e FBS 10%. As células são transfectadas com uma mistura de 100 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-019), 5 ml de OptiMEM I (Gibco 51985-034) e 30 µg de DNA de SB-luciferase por 4 horas a 37°C. A mistura de transfecção é então removida, e adiciona-se meio completo por 1 hora a 37°C. As células são tripsinizadas e ressuspensas em meio completo a 2×10^6 células/ml, e 50 µl são plaqueados em cada cavidade de uma placa de 96 cavidades Biocoat (BD 35-6461) e incubados por 1 hora a 37°C. Após o término da incubação, o meio é substituído por 100 µl de cada Fab a ser testado diluídos serialmente a 1:2, e pré-incubado por 1 hora a 37°C com uma solução 1:1 de 40 ng/ml de miostatina (R&D Systems 788-G8) ou GDF-11 (R&D Systems) em meio completo.

A placa é deixada de um dia para o outro a 37°C, CO₂ 5%, e no dia seguinte são adicionados 100 µl de uma mistura 1:1 de Tampão de Lise Glo e reagente de Luciferase Bright-Glo (Promega) a cada cavidade, sendo também misturados por pipetagem. Dessa mistura, 150 µl são transferidos para uma placa de 96 cavidades branca, e a luminescência é medida com o uso de um luminômetro. A luminescência é então tabulada contra a concentração de Fab, e a IC₅₀ para cada Fab por miostatina e GDF-11 é calculada.

Os Fabs testados com o uso das condições descritas acima geraram os valores de IC₅₀ listados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4

Fab	IC ₅₀ GDF-8	IC ₅₀ GDF-11
41H-A7	10 nM	40 nM
41L3F12	40 nM	100 nM
41C1A2	1 nM	1,2 nM
41C1A4	1 nM	2 nM
41C1E4	1 nM	4 nM
41C12A4	1 nM	4 nM
41C2A4	1 nM	4 nM
3-74/C1E4	1 nM	4 nM

Exemplo 6: Farmacocinética

A farmacocinética (PK) dos anticorpos da invenção pode ser avaliada em camundongos C57B6/SCID em uma dose de 1 mg/kg após uma administração única intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP). Os animais recebem uma mistura de anticorpo não marcado e marcado com ^{125}I em uma dose descrita acima, e a concentração sérica é determinada com base na radioatividade de ^{125}I no soro, e a atividade específica da dose injetada. É feito um gráfico da concentração sérica do anticorpo administrado IV ou IP versus tempo.

10 Exemplo 7: Efeito *in vivo* sobre a massa e a força musculares

Para determinar se um anticorpo da invenção bloqueia a atividade de miostatina *in vivo*, um anticorpo da invenção pode ser testado em camundongos SCID adultos. Camundongos SCID sofrem de uma grave deficiência imunológica combinada e, portanto, não geram uma reação imunológica após injeção de um anticorpo da invenção. A massa muscular é usada como um indicador da atividade de miostatina em camundongos tratados com um anticorpo da invenção.

Fêmeas de camundongos SCID/CB17 (Taconic Biotechnology) são pesadas e distribuídas em grupos de dez. Um anticorpo da invenção (41C1E4) em tampão de PBS é injetado por via subcutânea nos camundongos em várias doses (10, 5 e 2 mg/kg) nos dias 0 e 7. Em um grupo de controle, IgG a 10 mg/kg é injetada por via subcutânea nos camundongos nos dias 0 e 7. No 14º dia, a força muscular, a força do membro frontal, é medida com um medidor de força de preensão (por exemplo, modelo 1027 csx, Columbus Instruments). Os animais são sacrificados, e a massa muscular é avaliada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os pesos líquidos dos músculos gastrocnêmio e quadríceps também são medidos, além do peso corporal. Os resultados, as médias e os erros-padrão para os vários parâmetros são apresentados na Tabela 5 abaixo. Os dados são transformados por um método de transformação Box Cox para normalização dos dados. Os desvios de cada parâmetro são identificados por meios estatísticos com o programa JMP 5.1 (SAS, Inc.), e excluídos do conjunto de dados. A signifi-

cância estatística foi determinada por ANOVA e por um teste t de Student. Um valor de p de menos de 0,05 foi considerado significativo. O anticorpo testado a 5 mg/kg e 10 mg/kg gera resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo de controle de IgG para todos os parâmetros testados.

- 5 O anticorpo testado a 2 mg/kg gera resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo de controle de IgG para os parâmetros de RMN do músculo, peso líquido do quadríceps e peso líquido do gastrocnêmio.

Tabela 5

Grupo de estudo	PC inicial (g)	PC final (g)	RMN do músculo (g)	Peso líquido do quadríceps (mg)	Peso líquido do gastrocnêmio (mg)	Força de preensão (Newtons)
IgG de controle	19,82 ± 0,35	20,89 ± 0,33	15,17 ± 0,27	159,92 ± 4,13	92,84 ± 1,99	2,89 ± 0,08
41C1E4 2 mg/kg	19,92 ± 0,32	21,78 ± 0,22	16,27 ± 0,13	172,07 ± 1,53	102,13 ± 0,88	2,99 ± 0,07
41C1E4 5 mg/kg	19,94 ± 0,34	21,9 ± 0,37	16,54 ± 0,39	185,27 ± 4,67	108,16 ± 2,3	3,23 ± 0,04
41C1E4 10 mg/kg	19,9 ± 0,34	22,3 ± 0,4	16,99 ± 0,27	190,03 ± 3,2	109,5 ± 2,03	3,18 ± 0,08

PC = peso corporal

10 Listagem de Sequência

<110> ELI LILLY AND COMPANY
 <120> Anticorpos antimioestatina
 <130> X-17251
 <140> US 60/725,738

15 <141> 2005-10-12

<160> 158
 <170> PatentIn versão 3.3

<210>^F_{seq} 1

<211> 375

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile

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

Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300
 5 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 10 340 345 350
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375
 15 <210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 20 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30
 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
 25 35 40 45
 Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
 50 55 60
 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 65 70 75 80
 30 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly
 85 90 95

Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105
 <210> 3
 <211> 109
 5 <212> PRT
 <213> Ovis sp.
 <400> 3
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 10 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30
 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
 35 40 45
 Phe Leu Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
 15 50 55 60
 Asn Pro Lys Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 65 70 75 80
 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly
 85 90 95
 20 Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105
 <210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30
 30 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
 35 40 45

Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
 50 55 60
 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 65 70 75 80
 5 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
 85 90 95
 Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105
 <210> 5
 10 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 5
 gaggtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggact cactttcagt aggtatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggagagga ggctggagtg ggtcgcagcc attaatagtc atggtggtag cacctactat 180
 tcagacactg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 20 ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acagccttgt attactgtgc aagacttccg 300
 gactactggg gccaaaggcac cacggtcacc gtttccctca 339
 <210> 6
 <211> 324
 <212> DNA
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 6
 gaaaatgtgc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
 30 atgacctgca gggccagtc aagtgtagt tccagttact tgactggta ccagcagaag 120
 tcaggtgcct ccccaaaact ctggatctat agcacatcca acttggttc tggagtcct 180
 gctcgcttca gtggcagtg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagtgtggag 240

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtacagtg gttaccactt cacgttcggc 300

tcggggacca agctggaaat gaaa 324

<210> 7

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 7

10 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val

15 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser His Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

25 <210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Constructo sintético

<400> 8

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 5 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 10 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105
 15 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 9
 20 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 10
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 30 1 5 10
 <210> 11
 <211> 12

- <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
- 5 <400> 11
 Arg Ala Leu Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
- 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <220>
- 15 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
 <222> (3)..(3)
 <223> X is S ou L
 <220>
 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- 20 <222> (4)..(4)
 <223> X is S ou Q
 <400> 12
 Arg Ala Xaa Xaa Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
- 25 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 30 <223> Constructo sintético
 <400> 13

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 14

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 14

10 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 15

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr

20 1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asn

1 5

30 <210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 17

5 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 18

Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala

15 1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 19

Ser Thr Ser Asn Leu Val Phe

1 5

25 <210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Constructo sintético

<400> 20

Ser Thr Ser Asn Leu Thr Trp

1 5

<210> 21

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 21

10 Ser Thr Ser Asn Leu Met Asp

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 22

Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr

20 1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 23

Ser Thr Ser Asn Leu Val Trp

1 5

30 <210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 24

5 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 25

Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

15 1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 26

Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

25 <210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Constructo sintético

<400> 27

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Phe Phe Thr

1 5

<210> 28

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 28

10 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln Phe Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 29

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 30

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

1 5

30 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 31

5 Gln Leu Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 32

Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

15 1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 33

Gln His Tyr Leu Gly Tyr His Phe Thr

1 5

25 <210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Constructo sintético

<400> 34

Gln His His Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210> 35

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 35

10 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Trp Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 36

Gln Trp Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

20 1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO

<222> (2)..(2)

30 <223> X is Q, N, H, L, P ou W

<220>

<221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO

- <222> (3)..(3)
 <223> X is Y ou H
 <220>
 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- 5 <222> (4)..(4)
 <223> X is S ou L
 <220>
 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
 <222> (7)..(7)
- 10 <223> X is H, F, Q ou T
 <220>
 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
 <222> (8)..(8)
 <223> X is F ou W
- 15 <400> 37
 Gln Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Thr
 1 5
 <210> 38
 <211> 10
- 20 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 38
 Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
- 25 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 30 <223> Constructo sintético
 <400> 39

- Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Thr Met Ser
- 1 5 10
- <210> 40
- <211> 10
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Constructo sintético
- <400> 40
- 10 Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Pro Met Ser
- 1 5 10
- <210> 41
- <211> 10
- <212> PRT
- 15 <213> Artificial
- <220>
- <223> Constructo sintético
- <400> 41
- Gly Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
- 20 1 5 10
- <210> 42
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Constructo sintético
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (3)..(3)
- 30 <223> X is T ou N
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO

<222> (8)..(8)

<223> X is G, T ou P

<400> 42

Gly Leu Xaa Phe Ser Arg Tyr Xaa Met Ser

5 1 5 10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

10 <400> 43

Ala Ile Asn Ser His Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 44

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <400> 44

Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 45

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

30 <400> 45

Ala Ile Asn Ser Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 46

Ala Ile Asn Ser Val Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

10 1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 47

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

20 1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 48

Ala Ile Asn Ser Ile Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

30 1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 49

Ala Ile Asn Ser Met Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

10 <210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 50

Ala Ile Asn Ser Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

20 <210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Constructo sintético

<400> 51

Ala Ile Asn Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

30 <210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 52

5 Ala Ile Asn Ser Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 53

15 Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 54

25 Ala Ile Asn Ser Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 55

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

1 5 10 15

5 Gly

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 56

Ala Ile Asn Ser Ala Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

15 Gly

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 57

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

25 Gly

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 58

Ala Ile Asn Ser Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 59

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 59

Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <400> 60

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

1 5 10 15

Gly

<210> 61

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

30 <400> 61

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

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 62

Ala Ile Lys Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

10 1 5 10 15

Gly

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 63

Arg Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

20 1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 64

His Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

30 1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 65

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

1

5

10

15

Gly

10 <210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 66

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

1

5

10

15

Gly

20 <210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Constructo sintético

<400> 67

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

1

5

10

15

Gly

30 <210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 68

5 Ala Ile Lys Ser Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 69

15 Ala Ile Thr Ser Met Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 70

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 70

25 Ala Gln Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

- <223> Constructo sintético
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (1)..(1)
- 5 <223> X is A, R ou H
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (2)..(2)
- <223> X is I ou Q
- 10 <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (3)..(3)
- <223> X is N, T ou K
- <220>
- 15 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (4)..(4)
- <223> X is S ou A
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- 20 <222> (5)..(5)
- <223> X is H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I ou E
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (7)..(7)
- 25 <223> X is G ou S
- <220>
- <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO
- <222> (10)..(10)
- <223> X is Y ou K
- 30 <400> 71

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ser Thr Xaa Tyr Ser Asp Thr Val Lys

Gly

<210> 72

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 72

Leu Pro Asp Tyr

1

<210> 73

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 73

Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 74

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 74 _{Pro}

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 75
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 75
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 76
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 76

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

<210> 77

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 77

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

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 78
10 <211> 108
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Constructo sintético
15 <400> 78
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
25 65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Thr
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
30 <210> 79
<211> 108
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 79

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 80

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 80

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Ser
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 81
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 81
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 82
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 82

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Leu Tyr Ser Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 83

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 83

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 84
10 <211> 108
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Constructo sintético
15 <400> 84
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asn Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
25 65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
30 <210> 85
<211> 108
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 85

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 86

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 86

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 87
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 87
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 88
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 88

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 89

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 89

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 90
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 90
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Leu Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 91
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 91

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Leu Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Leu Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 92

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 92

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Leu Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 93
10 <211> 108
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Constructo sintético
15 <400> 93
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Phe Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
25 65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
30 <210> 94
<211> 108
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 94

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Thr Trp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 95

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 95

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Met Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 96
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 96
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 97
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 97

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Trp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 98

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 98

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 99
10 <211> 108
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Constructo sintético
15 <400> 99
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
25 65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
30 <210> 100
<211> 108
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 100

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Trp Tyr Ser Gly Tyr His

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 101

20 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 101

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

30 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 102
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 102
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 25 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 103
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 103

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

10 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

20 <210> 104

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Constructo sintético

<400> 104

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

30 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 10 <210> 105
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Constructo sintético
 <400> 105
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Val Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 30 100 105 110
 Ser
 <210> 106

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 106

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

10 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Glu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

20 100 105 110

Ser

<210> 107

<211> 113

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 107

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

30 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Ile Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 10 100 105 110
 Ser
 <210> 108
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 108
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ser Ala Ile Asn Ser Met Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 109

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 109

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

15 Ser Ala Ile Asn Ser Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 110

25 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

30 <400> 110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Ala Ile Asn Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 <210> 111
 15 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 20 <400> 111
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 25 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 30 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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 112

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 112

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

15 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

20

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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

25

Ser

<210> 113

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 113

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 5 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 10 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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 15 Ser
 <210> 114
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 114
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

5 Ser

<210> 115

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 115

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ala Ile Asn Ser Trp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

20 50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

25 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 116

<211> 113

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 116

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Ala Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

10 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

15 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 117

<211> 113

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 117

25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

30 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
5 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 <210> 118
 <211> 113
10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 118
15 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
20 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Ser Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
30 <210> 119
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 119

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

10 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

20 <210> 120

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Constructo sintético

<400> 120

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

30 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

10 <210> 121
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

15 <223> Constructo sintético
<400> 121

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
30 100 105 110

Ser

<210> 122

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 122

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

10 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

20 100 105 110

Ser

<210> 123

<211> 113

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 123

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

30 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 10 100 105 110
 Ser
 <210> 124
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 124
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Asn Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ser Ala Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 125

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 125

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

15 Ser Ala Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 126

25 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

30 <400> 126

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Ala Ile Lys Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 <210> 127
 15 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 20 <400> 127
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 25 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 30 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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 128

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 128

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

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

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

Ser His Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
20 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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

25 Ser

<210> 129

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 129

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 5 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 10 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 Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 15 Ser
 <210> 130
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 130
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Lys Ala Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

5 Ser
 <210> 131
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 131
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

20 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

25 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 <210> 132
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

30

<223> Constructo sintético

<400> 132

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Lys Ser Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

10 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

15 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 133

<211> 113

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 133

25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

30 35 40 45

Ser Ala Ile Lys Ser Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 5 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 <210> 134
 <211> 113
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 134
 15 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 20 35 40 45
 Ser Ala Gln Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 30 <210> 135
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 135

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

10 35 40 45

Ser Arg Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

20 <210> 136

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Constructo sintético

<400> 136

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

30 20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser
 10 <210> 137
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Constructo sintético
 <400> 137
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 20 25 30
 Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 30 100 105 110
 Ser
 <210> 138

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

10 20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val

50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

20 100 105 110

Ser

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 139

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 140

30 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 140

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

5 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

10 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Gly Tyr His

15 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 141

<211> 108

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 141

25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

30 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Gly Tyr His

85 90 95

5 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 142

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 142

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

15 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

20 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Gly Tyr His

25 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 143

<211> 23

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

5 <210> 144

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

10 Trp Tyr Ala Ala Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 145

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 145

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 20 25 30

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 146

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 147

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 148

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 149

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 149

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 20 25

<210> 150

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 150

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

30 <210> 151

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

5 <210> 152

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

10 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 153

15 <211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

20 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 154

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

30 <221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO

<222> (6)..(6)

<223> X is A, V, T, ou M

<220>

<221> REGIÃO DE INTERESSE SIOLÓGICO

<222> (7)..(7)

<223> X is S, A, T, N, W, D ou Y

5 <400> 154

Ser Thr Ser Asn Leu Xaa Xaa

1 5

<210> 155

<211> 106

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Val Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

15 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

20 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

25 Val Tyr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 156

<211> 315

<212> DNA

30 <213> Homo sapiens

<400> 156

	gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact	60
	gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag	120
	gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag	180
	gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac	240
5	aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc	300
	aacaggggag agtgc	315
	<210> 157	
	<211> 315	
	<212> DNA	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 157	
	gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact	60
	gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag	120
	gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag	180
15	gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac	240
	aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc	300
	aacaggggag agtgc	315
	<210> 158	
	<211> 970	
20	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 158	
	ggcccatcgg tcttcccgct agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc	60
	ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc	120
25	gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcttac agtcctcagg actctactcc	180
	gctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa	240
	cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatggtcc	300
	cccatgcca cctgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc	360
	cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacgt gcgtgggtgt	420
30	ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt	480
	gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag	540
	cgctctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc	600

caacaaaggc ctcccgctct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg 660
 agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag 720
 cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa 780
 tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg ctggactccg acggtctctt 840
 5 ctctctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc 900
 atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc 960
 tctgggttga 970

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal antimiostatina, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação à miostatina em um ensaio ELISA por competição com um anticorpo competidor compreendendo dois polipeptídeos com as seqüências mostradas nas SEQ ID N°: 98 e SEQ ID N°: 138, e sendo que o referido anticorpo antimiostatina monoclonal se liga à miostatina com uma afinidade de, no máximo, 5×10^{-12} M.

2. Anticorpo monoclonal antimiostatina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo se liga à miostatina com uma afinidade de, no máximo, $1,4 \times 10^{-12}$ M.

3. Anticorpo monoclonal antimiostatina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo apresenta uma IC_{50} menor ou igual a cerca de 1 nM em um ensaio de miostatina/SBE *in vitro* como mostrado no exemplo 5.

4. Anticorpo monoclonal antimiostatina de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a IC_{50} do referido anticorpo em um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* é pelo menos 20% menor do que a IC_{50} do anticorpo em um ensaio repórter GDF-11/SBE *in vitro* como mostrado no exemplo 5.

5. Anticorpo monoclonal antimiostatina, caracterizado pelo fato de que compreende dois polipeptídeos com as seqüências mostradas nas SEQ ID N°: 98 e SEQ ID N°: 138.

6. Anticorpo monoclonal antimiostatina caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, sendo que a dita região variável da cadeia pesada compreende:

- a) um peptídeo em CDRH1 com SEQ ID N°:42,
 - b) um peptídeo em CDRH2 com SEQ ID N°:71, e
 - c) um peptídeo em CDRH3 com SEQ ID N°:72,
- e em que a dita região variável da cadeia leve compreende:
- a) um peptídeo em CDRL1 com SEQ ID N°:12,
 - b) um peptídeo em CDRL2 com SEQ ID N°:154, e

c) um peptídeo em CDRL3 com SEQ ID NO:37.

7. Anticorpo monoclonal antimióstatina caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, sendo que a dita região variável da cadeia pesada compreende:

- a) um peptídeo em CDRH1 com SEQ ID NO:40,
- b) um peptídeo em CDRH2 com SEQ ID NO:60, e
- c) um peptídeo em CDRH3 com SEQ ID NO:72,

e sendo que a dita região variável da cadeia leve compreende:

- a) um peptídeo em CDRL1 com SEQ ID NO:9,
- b) um peptídeo em CDRL2 com SEQ ID NO:18, e
- c) um peptídeo em CDRL3 com SEQ ID NO:34.

8. Anticorpo monoclonal antimióstatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humanizado ou totalmente humano, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo.

9. Anticorpo monoclonal antimióstatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo de comprimento total, um anticorpo substancialmente intacto, um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂ ou um fragmento Fv de cadeia simples.

10. Anticorpo monoclonal antimióstatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região constante da cadeia pesada selecionada a partir do grupo consistindo em IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD.

11. Anticorpo monoclonal antimióstatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo não se liga a um peptídeo, que consiste em aminoácidos 40-64 de miostatina madura humana, à níveis significativamente maiores que o normal.

12. Anticorpo monoclonal antimióstatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a região constante presente no anticorpo se origina do genoma de um animal selecionado a partir do grupo consistindo em animais domésticos, animais de esportes e animais

que servem de fontes de alimentos.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

5 14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser para uso como um medicamento.

10 16. Uso de uma quantidade eficaz do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para aumento da massa muscular ou aumento da densidade óssea em um indivíduo em necessidade do mesmo.

15 17. Uso de uma quantidade eficaz do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de uma ou mais condições selecionadas a partir de fraqueza, caquexia, destruição muscular, fraqueza muscular, miopatia, distrofia muscular, osteoporose,
20 DPOC, insuficiência ou doença renal, insuficiência ou doença hepática, insuficiência cardíaca, diabetes do Tipo II ou síndrome metabólica.

FIG. 1 **Pró-miostatina**

1	<u>MOKLQLCVYI</u> <u>YLFMLIVAGP</u> <u>VDLNENSEQK</u> ENVEKEGLCN	40
41	ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL	80
81	LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT	120
121	MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK VVKAQLWIYL	160
161	RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGETRYTGIR SLKLDMPGT	200
201	GIWQSIDVKT VLQNLWKQPE SNLGIEIKAL DENGHDLAVT	240
241	FPGPGEDGLN PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR	280
281	CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK	320
321	YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII	360
361	YGKIPAMVVD RCGCS 376 (ID. DE SEQ. N°:1)	

FIG. 2 **Miostatina madura (humana, murídea, de rato, galinha, peru, cachorro, cavalo, porco)**

1	DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYK	40
41	<u>NYCSGECEFEV</u> <u>FLOKYPHTL</u> <u>VHQA</u> NPRGSA GPCCTPTKMS	80
81	PINMLYFNGK EQIIYGKIPA MVVDRCGCS	109 (ID. DE SEQ. N°:2)

FIG. 3 **Miostatina madura**

		58
Galinha	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
Cachorro	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
Cavalo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
Carneiro	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
Vaca	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
Porco	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGECEFEVFLQKYPHTH	
		109
		<u>SEQ ID</u>
Galinha	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
Cachorro	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
Cavalo	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
Carneiro	LVHQA NPGRSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS	3
Vaca	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
Porco	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2

FIG. 4 **Homologia miostatina:GDF-11**

Miostatina	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK
GDF-11	NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK

Miostatina	<u>ANYCSGECEFEVFLQKYPHTL</u> <u>VHQA</u> NPRGSAGPCCTPTK
GDF-11	ANYCSGQCEYMFQMOKYPHTLVQAQANPRGSAGPCCTPTK

Miostatina	MSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	(ID. DE SEQ. N°:2)
GDF-11	MSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS	(ID. DE SEQ. N°:4)

FIG. 5 Anticorpo original

DNA de HCVR YN41

5' - GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTC
CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACTTTCAGTAGGTATGGCA
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAGCC
ATTAATAGTCATGGTGGTAGCACCTACTATTCAGACACTGTGAAGGGCCG
ATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGA
ACAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGACTTCCG
GACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTTTCCTCA (ID. DE SEQ. N°:

5)

Aminoácidos de HCVR YN41

EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGLTFS RYGMSWVRQT PERRLEWVAA
INSHGGSTYY SDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARLP
DYWGQGTTVT VSS (ID. DE SEQ. N°: 7)

DNA de LCVR (Kappa) YN41

5' - GAAAATGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA
AAAGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACT
TGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGTGCCTCCCCAACTCTGGATCTAT
AGCACATCCAACTTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATG
CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCACTTCACGTTTCGGC
TCGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA (ID. DE SEQ. N°: 6)

Aminoácidos de LCVR (Kappa) YN41

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYHFTFG
SGTKLEMK (ID. DE SEQ. N°: 8)

FIG. 6 Alinhamento de CDR de cadeia leve

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
YN41	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYHFT</u>	24
41-1	RAS <u>Q</u> SVSSSYLH	10	STSNLAA	14	QHYSGYHFT	25
41-2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QNYSGYHFT	26
41-3	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYFFT	27
41-4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYQFT	28
41-5	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYTFT	29
41-6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYQFT	28
41-8	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYSFT	30
41-9	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-10	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QLYSGYHFT	31
41-12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-13	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-14	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-15	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-17	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QPYSGYHFT	32
41-18	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAN	16	QHYSGYHFT	25
41-19	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
41-20	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYQFT	28
411-1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-5	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-7	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAD	17	QHYSGYHFT	25
411-10	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-13	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAT	15	QHYSGYHFT	25
411-15	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QPYSGYHFT	32
411-16	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QPYSGYHFT	32
412-1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
412-5	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHLYGYHFT	33
412-6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
412-8	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHLYGYHFT	33
412-9	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHLYGYHFT	33
412-13	RA <u>L</u> SSVSSSYLH	11	STSNLAA	14	QHLYGYHFT	33
412-14	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHLYGYHFT	33
412-15	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHLYGYHFT	33
412-16	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAA	14	QHYSGYHFT	25
41L2-A1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVF	19	QHYSGYHFT	25
41L2-A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLTW	20	QHYSGYHFT	25
41L2-A3	RASSSVSSSYLH	9	STSNLMD	21	QHYSGYHFT	25
41L2-E3	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
41L2-E9	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVW	23	QHYSGYHFT	25
41L3-F12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHFT	34
41L3-G2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHWT	35
41L3-G6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QWYSGYHFT	36
41H-A7	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-B8	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25

FIG. 6 Continuação

41H-D6	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-D11	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E11	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E5	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E7	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E9	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-E12	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-F10	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41H-F12	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
41C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>HH</u> SGYHFT	34
41C1C1	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHWT	35
41C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>HH</u> SGYHFT	34
41C2A1	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHWT	35
41C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>HH</u> SGYHWT	36
41C2E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>H</u> YSGYHWT	35
41C2G8	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
3-74/C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
3-74/C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VY</u>	22	Q <u>HH</u> SGYHFT	34
3-74/C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>H</u> YSGYHFT	25
3-74/C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNL <u>VA</u>	18	Q <u>HH</u> SGYHWT	36
Consensus	RAX ₃ X ₄ SVSSSYLH	12	STSNLX ₆ X ₇	154	QX ₂ X ₃ X ₄ GYX ₇ X ₈ T	37
	X ₃ :S or L		X ₆ :A, V, T or M		X ₂ :Q, N, H, L, P or W	
	X ₄ :S or Q		X ₇ :S, A, T, N, W, D or Y		X ₃ :Y or H	
					X ₄ :S or L	
					X ₇ :H, F, Q or T	
					X ₈ :F or W	

FIG. 7 Alinhamento de CDR de cadeia pesada

Fab	CDR1	SEQ ID	CDR2	SEQ ID	CDR3	SEQ ID
		NO		NO		NO
YN41	<u>GLTFSRYGMS</u>	38	<u>AINSHGGSTYYSDTVKG</u>	43	<u>LPDY</u>	72
41-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-2	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-3	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-4	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-5	GLTFSRYGMS	38	AINSVGGSTYYSDTVKG	46	LPDY	72
41-6	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-8	GLTFSRYGMS	38	AINSEGGSTYYSDTVKG	47	LPDY	72
41-9	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-10	GLTFSRYGMS	38	AINSIGGSTYYSDTVKG	48	LPDY	72
41-11	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-12	GLTFSRYGMS	38	AINSMGGSTYYSDTVKG	49	LPDY	72
41-13	GLTFSRYGMS	38	AINSTGGSTYYSDTVKG	50	LPDY	72
41-14	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-16	GLTFSRYGMS	38	AINSKGGSTYYSDTVKG	51	LPDY	72
41-17	GLTFSRYGMS	38	AINSPGGSTYYSDTVKG	52	LPDY	72
41-18	GLTFSRYGMS	38	AINSCGGSTYYSDTVKG	53	LPDY	72
41-19	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-20	GLTFSRYGMS	38	AINSYGGSTYYSDTVKG	54	LPDY	72
411-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYADSVKG	73	LPDY	72
411-2	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
411-4	GLTFSRYGMS	38	AINSMGGSTYYSDTVKG	49	LPDY	72
411-5	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
411-6	GLTFSRYGMS	38	AINSWGGSTYYSDTVKG	55	LPDY	72
411-7	GLTFSRYGMS	38	AINSAAGGSTYYSDTVKG	56	LPDY	72
411-10	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
411-11	GLTFSRYGMS	38	AINSDGGSTYYSDTVKG	57	LPDY	72
411-12	GLTFSRYGMS	38	AINSCGGSTYYSDTVKG	53	LPDY	72
411-13	GLTFSRYGMS	38	AINSLGGSTYYSDTVKG	58	LPDY	72
411-14	GLTFSRYGMS	38	AINSNGGSTYYSDTVKG	59	LPDY	72
411-16	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-5	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-6	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
412-8	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-9	GLTFSRYTMS	39	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
412-13	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-14	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-15	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-16	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41L2-A1	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-A2	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-A3	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-E3	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-E9	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-F12	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-G2	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-G6	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-A7	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-B8	GLNFSRYGMS	41	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-D6	GLTFSRYGMS	38	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41H-D11	GLTFSRYGMS	38	AIKSNGGSTYYSDTVKG	62	LPDY	72
41H-E11	GLTFSRYGMS	38	RIKSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41H-E4	GLTFSRYGMS	38	HIKSSGGSTYYSDTVKG	64	LPDY	72
41-E5	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTKYSDTVKG	65	LPDY	72

FIG 7 Continuação

41H-E7	GLTFSRYGMS	38	AI <u>KAS</u> GGSTYYSDTVKG	66	LPDY	72
41H-E9	GLTFSRYGMS	38	AI <u>KSSGS</u> STYYSDTVKG	67	LPDY	72
41H-E12	GLTFSRYGMS	38	AI <u>KSL</u> GGSTYYSDTVKG	68	LPDY	72
41H-F10	GLTFSRYGMS	38	AI <u>TSM</u> GGSTYYSDTVKG	69	LPDY	72
41H-F12	GLTFSRYGMS	38	A <u>QTSS</u> GGSTYYSDTVKG	70	LPDY	72
41C1A2	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	<u>RITSS</u> GGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1A4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	<u>RITSS</u> GGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1C1	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>KSS</u> GGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C1E4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>TSS</u> GGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A1	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>TSS</u> GGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>TSS</u> GGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2E4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>KSS</u> GGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C2G8	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	<u>RITSS</u> GGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A2	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	<u>RITSS</u> GGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	<u>RITSS</u> GGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1E4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>TSS</u> GGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
3-74/C2A4	GLTFSRY <u>PMS</u>	40	AI <u>TSS</u> GGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
Consensus	GLX ₃ FSRYX ₈ MS	42	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₇ STX ₁₀ YSDTVKG	71		
	X ₃ :T or N		X ₁ :A, R or H			
	X ₈ :G, T or P		X ₂ :I or Q			
			X ₃ :N, T or K			
			X ₄ :S or A			
			X ₅ :H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I or E			
			X ₇ :G or S			
			X ₁₀ :Y or K			

FIG. 8

Constante kappa (ID. DE SEQ. N°: 155)

VAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DNA da constante kappa (ID. DE SEQ. N°: 156)

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGC

IgG4S->P Delta K (ID. DE SEQ. N°: 157)

GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

IgG4S->P Delta K DNA (ID. DE SEQ. N°: 158)

GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
GCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCC
CCCATGCCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCC
CCCAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGGCCTCCCGTCTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAGGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
TCTGGGTTGA

Fig 9 Continuação

	CDR1	CDR2	CDR3	ID. DE SEQ. N°:
41I3-F12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		98	
41I3-G2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		99	
41I3-G6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		100	
41H-A7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-B8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-D6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-D11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E9	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-E12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-F10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41H-F12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		89	
41C1A2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		96	
41C1A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		101	
41C1C1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		99	
41C1E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		98	
41C2A1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		99	
41C2A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		141	
41C2E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		102	
41C2G8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		96	
3-74/C1A2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		95	
3-74/C1A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		140	
3-74/C1E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		98	
3-74/C2A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQOKPGQAPRLLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOHSGYHFTFGG		142	
L-FR1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC			
L-FR2	WYAAKPGQAPRLLIY	ID. DE SEQ. N°: 143		
L-FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYV	ID. DE SEQ. N°: 144		
L-FR4	FGGGTKVEIK	ID. DE SEQ. N°: 145		
L-FR4B	FGGGTKLEIK	ID. DE SEQ. N°: 146		
		ID. DE SEQ. N°: 147		

Fig. 10 Alinhamentos de seqüência de cadeia pesada

[illegible]

Fig 10 Continuação

N°:	CDR1	CDR2	CDR3	ID. DE SEQ.
41L2-E9	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	120
41L3-F12	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	120
41L3-G2	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	120
41L2-G6	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	120
41H-A7	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	123
41H-B8	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	124
41H-D6	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	125
41H-D11	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	126
41H-E11	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	127
41H-E4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	128
41-E5	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	129
41H-E7	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	130
41H-E9	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	131
41H-E12	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	132
41H-F10	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	133
41H-F12	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	134
41C1A2	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	135
41C1A4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	135
41C1C1	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	136
41C1E4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	123
41C2A1	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	123
41C2A4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	123
41C2E4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	136
41C2G8	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	135
3-74/C1A2	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	137
3-74/C1A4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	137
3-74/C1E4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	138
3-74/C2A4	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	ITSSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPDYWGQGT	138
H-FR1	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	ID. DE SEQ. N°: 148		
H-FR1B	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	ID. DE SEQ. N°: 149		
H-FR2	WVRQAPGKGLEWVS	ID. DE SEQ. N°: 150		
H-FR2B	WVRQAPGKGLVWVS	ID. DE SEQ. N°: 151		
H-FR3	REFISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	ID. DE SEQ. N°: 152		
H-FR3B	REFISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	ID. DE SEQ. N°: 153		
H-FR4	WGQGT	ID. DE SEQ. N°: 139		

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPO MONOCLONAL ANTIMIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E SEU USO".**

- A presente invenção refere-se a anticorpos antimiostatina que
- 5 são caracterizados como tendo uma alta afinidade e que podem ser anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, imunoconjugados dos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Os anticorpos da invenção são úteis para o aumento da massa muscular, aumento da densidade óssea, ou para o tratamento de vários distúrbios em espécies
- 10 mamíferas e aviárias.