

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 462**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2006 E 06816225 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1951755**

54 Título: **Anticuerpos anti-miostatina**

30 Prioridad:

12.10.2005 US 725738 P

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

10.04.2015

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**DAVIES, JULIAN;
JONES, BRYAN EDWARD;
KORYTKO, ANDREW IHOR;
MITCHELL, PAMELA JEAN;
SMITH, ROSAMUND CAROL;
O'BRYAN (NEE TOBIAS), LINDA O. y
WANG, RONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 462 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-miostatina

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

Existe una necesidad terapéutica de un anticuerpo anti-miostatina que una preferentemente la miostatina a otras proteínas de la superfamilia de TGF- β , en particular GDF-11. Además, existe una necesidad de anticuerpos específicos anti-miostatina que unan la miostatina con una afinidad elevada, en particular una afinidad superior (es decir, una afinidad más fuerte como se muestra por ejemplo en un valor de K_D menor), que con la que se unen a GDF-11, y que permitan de ese modo que el nivel de dosis que los pacientes reciben se minimice de ese modo lo que puede dar como resultado una dosificación menos frecuente con un anticuerpo de ese tipo que con un anticuerpo que se une a la miostatina con una afinidad menor (es decir, una K_D superior). También se desea un anticuerpo de alta afinidad porque puede permitir una mayor flexibilidad en la vía de administración del anticuerpo a un paciente ya que es menos deseable que un fármaco se administre por vía intravenosa que por vía subcutánea, por ejemplo. También existe una necesidad de anticuerpos específicos de miostatina con un valor de CI_{50} bajo o de otro modo favorable en un ensayo de bioactividad de miostatina con el fin de generar un anticuerpo anti-miostatina terapéutico con una dosis terapéutica eficaz mínima. También se desea proporcionar anticuerpos específicos para miostatina en los que cualquier respuesta inmune al anticuerpo evocada por un paciente que recibe el anticuerpo se reduce a un mínimo. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales anti-miostatina quiméricos o humanizados, y porciones de unión a antígeno de los mismos, que antagonizan o neutralizan al menos una actividad o propiedad biológica *in vitro* o *in vivo* asociada con la miostatina o una porción de la misma. Los anticuerpos de la invención no se unen a un péptido que consiste en los aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 o 45-59 de miostatina madura, preferentemente miostatina humana, a niveles significativamente superiores que los del fondo.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo de miostatina que comprende un polipéptido de región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 98 y un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 138. Preferentemente, el anticuerpo de miostatina de acuerdo con la presente invención comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD. Preferentemente, en el anticuerpo de miostatina de acuerdo con la presente invención la región constante presente en el anticuerpo se origina a partir del genoma que un animal seleccionado entre animales domésticos, animales para deportes y animales fuente de alimento.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

En una realización, los anticuerpos de la invención tienen una CI_{50} inferior a 1 nM en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* (véase el Ejemplo 5). Preferentemente los anticuerpos de invención tienen una CI_{50} en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* al menos cuatro veces inferior a la CI_{50} del anticuerpo en un ensayo de indicador de GDF-11/SBE *in vitro* (como se describe en el Ejemplo 5 en el presente documento).

En una realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una afinidad de unión fuerte (K_D) hacia la miostatina, es decir, inferior a aproximadamente $1,4 \times 10^{-12}$ M. Como alternativa, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una K_D para la miostatina no superior a $1,4 \times 10^{-12}$ M.

Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender una región constante de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD humana (o básicamente de origen humano), preferentemente IgG₁ o IgG₄. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender adicionalmente una región constante de cadena ligera kappa o lambda humana. Cuando el anticuerpo se va a usar como un agente terapéutico o preventivo en un ser humano, la región constante preferentemente es básica o totalmente de origen humano. Cuando el anticuerpo se va a usar como un agente terapéutico o preventivo en un animal no humano, un huevo de un animal no humano, la región constante preferentemente se origina básicamente a partir del animal en el que es el anticuerpo se va a usar como un agente

terapéutico (véase, por ejemplo, Clarkson, C. y *col.*, Mol. Imm. 30: 1195-1204, 1993; Solicitud de Estados Unidos número 2002/01651350; y números de registro en Genbank X69797, U03778, X16701, X07174, AB016711).

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

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

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

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

La invención representa un artículo de fabricación que comprende un material de envase y un anticuerpo de la invención contenido en dicho material de envase y en el que el material de envase comprende un prospecto que indica que el anticuerpo neutraliza una actividad de miostatina o disminuye el nivel de miostatina presente en el sistema.

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

Breve descripción de las figuras

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

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

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

La FIG. 4 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la miostatina humana y GDF-11 humano.

La FIG. 5 muestra la secuencia de aminoácidos de las HCVR y LCVR del anticuerpo YN41, un anticuerpo precursor a modo de ejemplo de anticuerpos de la invención. La figura muestra adicionalmente una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo que codifica la HCVR y LCVR del anticuerpo YN41.

La FIG. 6 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR de la LCVR de diversos anticuerpos.

La FIG. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR de la HCVR de diversos anticuerpos.

FIG. 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa de cadena ligera que se puede unir de forma operativa a la LCVR de un anticuerpo de la invención en la generación de una cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de un dominio de región constante de IgG4 que se quede unir de forma operativa a la HCVR de un anticuerpo de la invención en la generación de una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo de la invención. La figura muestra adicionalmente una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo que codifica la región constante kappa de cadena ligera y una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo que codifica un dominio de IgG4 de cadena pesada.

La FIG. 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las LCVR de diversos anticuerpos. Los dominios de CDR están subrayados en la primera secuencia de anticuerpos.

La FIG. 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las HCVR de diversos anticuerpos. Los dominios de CDR están subrayados en la primera secuencia de anticuerpos.

Descripción detallada de la invención

La invención presenta anticuerpos monoclonales anti-miostatina quiméricos o humanizados o porciones de unión a antígeno de los mismos capaces de neutralizar o antagonizar al menos una actividad de miostatina *in vitro* y/o *in vivo* que preferentemente se caracteriza que demuestran una CI_{50} inferior a aproximadamente 1 nM en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* y que demuestran una afinidad de unión fuerte con la miostatina. Los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente por que se unen a la miostatina sobre el homólogo más cercano de la miostatina, GDF-11 en al menos un 20 %.

Definiciones

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "miostatina madura" (véase la SEC ID N°: 2 para especies humanas, murina, rata, pollo, pavo, canina, equina y porcina) se refiere a la forma monomérica o la forma homodimérica de la proteína que resulta después de la escisión proteolítica en Arg 266 de la forma de proproteína del aminoácido 375 de la miostatina. Cuando se usa en el presente documento, el término "miostatina" se refiere a miostatina madura. Cuando usan el presente documento, el término "promiostatina" o "forma de proproteína de miostatina" cuando se usa con referencia a la proteína humana se refiere a una proteína que comprende la secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 1 como un monómero u homodímero.

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

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

El término "anticuerpo" por referencia a un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención (o simplemente, "anticuerpo monoclonal de la invención"), como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano, a menos que se indique de otro modo en

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

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman los sitios de unión a antígeno del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo de IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Como se usa en el presente documento, la "porción de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere indistintamente en el presente documento a esa porción de una molécula de anticuerpo, dentro de la región variable, que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad hacia el antígeno. Esta porción de anticuerpo incluye los restos de aminoácidos del marco conservado necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno. Preferentemente, las CDR de la región de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención serán de origen murino o básicamente de origen murino con determinados restos de aminoácidos alterados para mejorar una actividad en particular (véanse por ejemplo, las Figs. 6 y 7). Preferentemente, las regiones del marco conservado de anticuerpos de la invención son de origen humano o básicamente de origen humano (al menos de origen humano en un 95 %, un 97 % o un 99 %; véanse por ejemplo, las Figs. 9 y 10). En otras realizaciones, la región de unión a antígeno, o las CDR de la región de unión a antígeno, pueden tener su origen a partir de otras especies no humanas que incluyen, pero no se limitan a, conejo, rata o hámster. En otras realizaciones, la región de unión a antígeno puede ser totalmente de origen humano o básicamente de origen humano con determinados restos de aminoácidos alterados para mejorar una actividad en particular, por ejemplo, afinidad o especificidad (véanse por ejemplo, las posiciones de los aminoácidos de las Figs. 6 y 7 que están en letra negrita y subrayadas).

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

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

Una "variante" de anticuerpo anti-miostatina, se refiere en el presente documento una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos a partir de un anticuerpo anti-miostatina "precursor" en virtud de la adición, supresión y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de anticuerpo precursor. En la realización precedente, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones de CDR del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una (por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco) sustituciones en una o más regiones de CDR del anticuerpo precursor. La identidad o la homología con respecto a la secuencia variante se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia variante que son idénticos con los restos de anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones N-terminal, C-terminal, o interna, en la secuencia de anticuerpos afecta a la identidad u homología de la secuencia. La variante mantiene la capacidad de unirse a la miostatina y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, CI₅₀ menor en un ensayo de SBE/indicador o aumento de la capacidad para inhibir una bioactividad de miostatina. La variante de anticuerpo de interés en particular en el presente documento es una que presenta al menos aproximadamente un aumento de la actividad biológica al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, y más preferentemente al menos aproximadamente 20, 30, o 50 veces cuando se compara con el anticuerpo precursor.

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

La expresión "se une de forma específica", como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no se une de forma significativa a moléculas distintas de su o sus compañeros de unión específicos como se mide mediante una técnica disponible en la técnica por ejemplo, mediante ELISA de competición, ensayo de BIACORE o ensayo de KINEXA. La expresión también se puede aplicar cuando por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítipo en particular que es portado por un número de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico que porta el dominio de unión a antígeno será capaz de unirse de forma específica a los diversos antígenos que portan el epítipo. En consecuencia un anticuerpo monoclonal de la presente invención se une de forma específica a GDF-8 y GDF-11.

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

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

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

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

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

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

%, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o superior.

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

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

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

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

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

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

Caracterización de Anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales, aislados que se unen específicamente a la miostatina con afinidad elevada. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos quiméricos o humanizados o porciones de unión a antígeno de los mismos. Además, los anticuerpos de la invención neutralizan una actividad biológica de la miostatina *in vivo* o *in vitro*. La unión específica de anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención a la miostatina permite que los anticuerpos de la invención se usen como agentes terapéuticos o profilácticos para afecciones, enfermedades o trastornos asociados con la miostatina, es decir, - afecciones, enfermedades o

trastornos que se benefician de la reducción de los niveles de miostatina o que antagonizan o inhiben una actividad biológica de la miostatina.

En una realización preferente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que se une a la miostatina o una porción de la misma con una afinidad de unión (K_D) para la miostatina inferior o igual a aproximadamente $1,4 \times 10^{-12}$ M. Como alternativa, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una K_D para la miostatina no superior a aproximadamente $1,4 \times 10^{-12}$ M. Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento.

Preferentemente, tales anticuerpos de la invención caracterizados por una fuerte afinidad de unión como se describe en el presente documento también tienen una CI_{50} de 1 nM in en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro*. Los anticuerpos caracterizados por una fuerte afinidad de unión como se describe en el presente documento tienen una CI_{50} en un ensayo de indicador de miostatina/SBE *in vitro* de al menos un 20 % inferior, más preferentemente al menos aproximadamente dos veces, tres veces o cuatro veces inferior que la CI_{50} del anticuerpo en un ensayo de indicador de GDF-11/SBE *in vitro* (como se describe en el Ejemplo 5 en el presente documento). Preferentemente, tales anticuerpos de la invención caracterizados por una fuerte afinidad de unión como se describe en el presente documento se caracterizan adicionalmente por que reaccionan preferentemente con GDF-8 sobre GDF-11 en al menos un 20 % como se mide mediante una técnica disponible en la técnica por ejemplo, mediante ELISA de competición, o mediante ensayo de BIACORE o KINEXA para demostrar una afinidad superior en al menos un 20 % (es decir, K_D inferior) del anticuerpo para GDF-8 que para GDF-11.

Preferentemente los polipéptidos de miostatina y GDF-11 sometidos a ensayo para la unión preferente de un anticuerpo de la invención son ambas formas homodiméricas de la proteína madura, preferentemente de origen mamífero o aviar, incluso más preferentemente de origen humano. Sin embargo, los polipéptidos de miostatina y GDF-11 sometidos a ensayo para la unión preferente de un anticuerpo de la invención pueden ser la forma monomérica de la proteína madura o la forma de la proproteína.

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

Se pueden usar otros procedimientos adecuados para producir o alisar anticuerpos de la invención, que incluyen, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante (por ejemplo, Fv o Fab de una sola cadena) a partir de una biblioteca, o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (véase por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555, 1993; Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258, 1993; Lonberg y col., Patente de Estados Unidos Número 5.545.806; Surani y col., Patente de Estados Unidos Número 5.545.807).

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

Además, también se pueden producir porciones funcionales de anticuerpos, que incluyen porciones de unión a antígeno de anticuerpos quiméricos, humanizados o de cadena individual. Las porciones funcionales de los anticuerpos mencionados anteriormente mantienen al menos una función de unión a antígeno y/o función o bioactividad biológica del anticuerpo de longitud completa a partir de los que provienen. Las porciones funcionales preferentes mantienen una función de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (por

ejemplo, la capacidad para unirse a una forma madura de mamífero de miostatina). Las porciones o fragmentos funcionales particularmente preferentes mantienen la capacidad de inhibir una o más funciones o bioactividades características de una miostatina madura de mamífero, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, una porción o fragmento funcional puede inhibir la interacción de la miostatina madura con uno o más de sus ligados y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por receptores.

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

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

Variantes de Anticuerpos

Un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo humano (producidos por ejemplo, en un ratón transgénico) generados frente a miostatina o frente a una proteína que comprende un epítipo inmunogénico de la invención es un anticuerpo precursor. Un anticuerpo precursor murino se puede alterar adicionalmente para crear una forma quimérica o humanizada del anticuerpo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden servir como anticuerpos precursores para variación o mutagénesis adicional. Los anticuerpos precursores de la invención se pueden mutagenizar adicionalmente por ejemplo, dentro del dominio o dominios de CDR (véanse, por ejemplo, las Figs. 6 y 7) para crear una variante de anticuerpo con una propiedad de interés optimizada, por ejemplo, afinidad de unión, CI₅₀, especificidad, etc. Una variante de anticuerpo de sustitución de aminoácidos es preferente y tiene al menos un resto de aminoácidos de la molécula de anticuerpo precursor retirado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones de CDR, pero también se contemplan alteraciones del FR. Son preferentes las sustituciones conservativas de aminoácidos. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica del anticuerpo, entonces se pueden introducir más cambios básicos, es decir, cambios no conservativos de aminoácidos, y los productos se pueden identificar sistemáticamente.

Una forma conveniente para generar variantes de sustitución es la maduración de afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de la región CDR se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de este modo se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes de presentación de fagos se identifican sistemáticamente a continuación por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión, especificidad, CI₅₀) como se desvela en el presente documento. Para identificar los sitios candidatos de la región CDR para modificación, se pueden preparar mutágenos de exploración de alanina para identificar restos de la región CDR que contribuyen de forma significativa a la unión a antígenos. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y la miostatina. Tales restos de contacto y restos vecinales son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento o que se conocen en la técnica. Como alternativa, o además, se puede realizar mutagénesis aleatoria en una o más secuencias de CDR en una o más posiciones del resto, cualquiera mientras que la CDR se une de forma operativa a la región variable o mientras que la CDR es independiente de otra secuencia de región variable y a continuación la CDR alterada vuelve a la región variable usando tecnología del ADN recombinante. Una vez que se generan y se expresan tales variantes de anticuerpos, el panel de variantes se somete a identificación sistemática como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

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

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

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

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

Secuencia

Además, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo monoclonal que comprende dos polipéptidos con las secuencias de las SEC ID N°: 98 y 138.

En un anticuerpo humanizado para uso terapéutico en seres humanos, la secuencia de marco conservado es preferentemente total o básicamente de origen humano (es decir, al menos de un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de origen humano). Por ejemplo, el anticuerpo 3-74/C1E4 comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR1 con la SEC ID N°: 143, CDR1 con la SEC ID N°: 9, FR2 con la SEC ID N°: 144, CDR2 con la SEC ID N°: 18, FR3 con la SEC ID N°: 145, CDR3 con la SEC ID N°: 25 y FR4 con la SEC ID N°: 146. El anticuerpo 3-74/C1E4 comprende adicionalmente una región variable de cadena pesada que comprende FR1 con la SEC ID N°: 149, CDR1 con la SEC ID N°: 40, FR2 con la SEC ID N°: 151, CDR2 con la SEC ID N°: 60, FR3 con la SEC ID N°: 153, CDR3 con la SEC ID N°: 72 y FR4 con la SEC ID N°: 139. En un anticuerpo para uso en un animal no humano, la secuencia de la región de marco conservado se puede originar básicamente a partir del genoma humano (preferentemente usada en un animal no humano cuando es un embrión o recién nacido) o a partir del genoma del animal en el que se va a usar de forma terapéutica.

Expresión de Anticuerpos

La presente invención también se refiere a líneas celulares que expresan un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención o porción del mismo. La creación y el aislamiento de líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se puede realizar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Las líneas celulares preferentes incluyen COS, CHO, SP2/0, NS0 y levadura (disponibles en depósitos públicos tales como la ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA).

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

Un anticuerpo de la invención se puede preparar mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transforma, transduce, infecta o similar con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y/o pesada se expresan en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de promotores diferentes a los que se unen de forma operativa en un vector o, como alternativa, la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de diferentes promotores a los que se unen de forma operativa en dos vectores – uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera. Opcionalmente la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar en diferentes células huésped. Preferentemente, los anticuerpos recombinante se secretan en el medio en el que se cultivan las

células huésped, a partir del que los anticuerpos se pueden recuperar o purificar. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante, e introducir los vectores en células huésped. Tales tecnologías convencionales de ADN recombinante se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch, y Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, y *col* (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

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

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

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

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

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

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

el gen *neo* (para selección de G418), y glutamina sintetasa (GS) en una línea celular negativa para GS (tal como NS0) para selección/amplificación.

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

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

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

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

Anticuerpo quimérico

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

Una cadena pesada quimérica de un anticuerpo comprende una región de unión a derivada de la cadena pesada de un anticuerpo no humano específico para la miostatina, que se une de forma operativa al menos a una porción de una región constante de cadena pesada humana o básicamente humana (o especies diferentes a aquellas a partir de las que se originó la región de unión a antígeno) tal como CH1 o CH2, o preferentemente a una región constante de cadena pesada de longitud completa. Una cadena ligera quimérica de un anticuerpo para uso en seres humanos comprende una región de unión a antígeno originada total o básicamente a partir de la cadena ligera de un

anticuerpo no humano específico para miostatina, unido de forma operativa al menos a una porción de una región constante de cadena ligera (CL) humana o básicamente humana (o especies diferentes a aquéllas a partir de las que se originó la región de unión a antígeno) o preferentemente para una región constante de cadena ligera de longitud completa. También se pueden preparar anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas pesadas y cadenas ligeras quiméricas de la misma o diferente especificidad de unión a la región variable, mediante la asociación apropiada de las cadenas de polipéptidos individuales, de acuerdo con etapas de procedimiento conocidas.

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

Anticuerpos humanizados

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

Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" tiene las CDR que se originan a partir de un anticuerpo no humano (preferentemente un anticuerpo monoclonal de ratón) aunque el marco conservado y la región constante, hasta el punto en que están presentes, (o una porción significativa o básica de los mismos, es decir, al menos aproximadamente un 90 %, un 92 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 %) están codificados por una información de la secuencia de ácidos nucleicos que se produce en la región de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase, por ejemplo, la Bases de Datos Internacional ImMunoGeneTics) o en formas de combinadas o mutadas de la misma tantos si tales anticuerpos se producen o no en células humanas. Las CDR de un anticuerpo humanizado se pueden optimizar a partir de las CDR de un anticuerpo precursor no humano a partir del que se originan para generar propiedades deseadas, por ejemplo, especificidad, afinidad y capacidad. Las CDR optimizadas pueden tener sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos, cuando se comparan con las CDR precursoras. Por ejemplo, las posiciones de los aminoácidos de las CDR que están subrayadas y en letra negrita en las Figs. 6 y 7 son posiciones que se han optimizado a partir de las CDR precursoras como se muestra en la Fig 5.

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

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

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

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender o puede tener su origen en un marco conservado de cadena ligera de línea germinal humana. En realizaciones en particular, la secuencia de la línea germinal de cadena ligera se selecciona entre secuencias de VK humanas que incluyen, pero no se limitan a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, y O8. En determinadas realizaciones, este marco conservado de línea germinal humana de cadena ligera se selecciona entre V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, y V5-6. Véase el documento de PCT WO 2005/005604 para una descripción de diferentes secuencias de la línea germinal.

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

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

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

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

En cualquier procedimiento, se obtienen la secuencia de ADN que codifica las regiones HCVR y LCVR del

anticuerpo anti-miostatina preferentemente murino. En la técnica se conocen bien procedimientos para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas. Tales procedimientos, por ejemplo, pueden implicar la amplificación de las secuencias que codifican inmunoglobulina a clonar usando cebadores apropiados mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los celadores adecuados para amplificar secuencias de ácidos nucleicos de inmunoglobulina, y específicamente secuencias de HCVR y LCVR de murino se han informado en la bibliografía. Después de haber clonado tales secuencias que codifican inmunoglobulina, se secuencian mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

Usos

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, profilácticas y de investigación como se describe en el presente documento. Un anticuerpo de la invención se puede usar para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociado con la expresión de la miostatina humana. De una forma similar, el anticuerpo de la invención se puede usar en un ensayo para controlar los niveles de miostatina en un sujeto que se está tratando para una afección asociada con la miostatina. La aplicación de investigación incluye procedimientos que usan el

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

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

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

Usos Terapéuticos para el Anticuerpo

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

Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención se puede usar para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea, disminuir la atrofia muscular, o puede ser útil para el tratamiento o prevención de afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables a la disminución de niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico en mamíferos, preferentemente seres humanos, que incluye, pero no se limita a, atrofia muscular, lesión muscular, cirugía, reparación de músculo dañado, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamento, obesidad, supresión de acumulación de grasa corporal, obesidad, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía de cuidado crítico, miopatía alcohólica, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por el VIH, o que resulta de EPOC, enfermedad pulmonar crónica, recuperación de sepsis, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico, atrofia muscular después de quemadura, y diabetes de Tipo II. La atrofia por desuso puede dar como resultado numerosas causas o incidentes que incluyen cualquier trastorno o enfermedad o estado que conduce a la inmovilidad prolongada o desuso o descanso en cama que incluye, pero no se limita a, trasplante de órganos sólidos, sustitución de articulaciones, apoplejía, lesión de la médula espinal, recuperación de quemaduras graves,

hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación después de sepsis y exposición a microgravedad. Dado que la miostatina se conserva altamente en secuencia y funciona a través de las especies, los anticuerpos de la invención se pueden usar para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea o tratar o prevenir afecciones en mamíferos no humanos o especies caviaras [por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, canino y felino), animales para deportes (por ejemplo, equino), animales fuente de alimentos (por ejemplo, bovino, porcino y ovino), especies aviares (por ejemplo, pollo, pavo, otras aves de caza o aves de corral)] en los que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico.

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

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

- Composición Farmacéutica

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

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

Una composición farmacéutica de la invención es preferentemente una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, se sopesa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, dado que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz es al menos la dosis mínima, pero inferior a la dosis tóxica, de un agente activo que es necesario para transmitir beneficio terapéutico a un sujeto. indicado de otro modo, una cantidad terapéutica mente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad en la que, en mamíferos, preferentemente seres humanos, aumenta la masa muscular, aumenta la densidad ósea, o tratar afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina da como resultado un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano, que incluyen, pero no se limitan, atrofia muscular, lesión muscular, cirugía debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamento, obesidad, supresión de

acumulación de grasa corporal, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía de cuidado crítico, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por el VIH, o que resulta de EPOC, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico y diabetes de Tipo II. La atrofia por desuso puede dar como resultado numerosas causas o incidentes que incluyen cualquier trastorno o enfermedad o

5 patología que conduce a inmovilidad prolongada o desuso o descanso en cama que incluyen, pero no se limitan a, trasplante de órganos sólidos, sustitución de articulaciones, apoplejía, lesión de la médula espinal, recuperación de quemaduras graves, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación después de sepsis y exposición a microgravidad.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación, o

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

La composición farmacéutica por lo general debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en el envase proporcionado, que incluye por ejemplo, un vial cerrado herméticamente o jeringa. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas se pueden filtrar de forma estéril después de fabricar la formulación, o de otro modo se pueden fabricar de forma microbiológicamente aceptable. Una composición habitual para infusión intravenosa podría tener un volumen de tanto como 250-1000 ml de fluido, tal como solución de Ringer estéril,

20 solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéutica mente eficaz, (por ejemplo, de 1 a 100 mg/ml, o superior) de concentración de anticuerpo. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto en particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se están administrando de forma simultánea. Una dosis habitual puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se conciben dosis inferiores o superiores a este intervalo a modo de ejemplo, especialmente teniendo en cuenta los factores que se han mencionado anteriormente. El régimen diario de dosificación parenteral puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a 1

30 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día. El progreso se puede controlar mediante evaluación periódica. Para administraciones repetidas durante varios días o períodos más largos, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no se excluyen de los mismos. La dosificación deseada se puede administrar mediante una administración de un solo bolo, mediante

35 administraciones de múltiples bolos, o mediante administración de infusión continua de anticuerpo, dependiendo del patrón del deterioro farmacocinético que el profesional desea conseguir.

Estas cantidades de anticuerpos sugeridas están sometidas en gran medida al criterio terapéutico. El factor fundamental para la selección de una dosis apropiada y programación es el resultado obtenido. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el mamífero en particular que se

40 está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo en particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para almacenamiento y reconstitución en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de

45 pérdida de actividad del anticuerpo. Puede ser necesario el ajuste de las dosificaciones para compensar lo anterior. Generalmente, el pH preferente está entre 6 y 8.

Artículos de Fabricación.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o prevención de los trastornos o afecciones que se han descrito anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una marca. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los envases se pueden formar a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición de la invención que es eficaz para prevenir o tratar el trastorno o afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición

55 es un anticuerpo anti-miostatina de la invención. La marca en el envase, o asociada al mismo, indica que la composición se para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable a, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y

60 prospectos con instrucciones de uso.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayos de ELISA

5 A. Placas revestidas con miostatina y GDF-11

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

10 Cada pocillo de dos placas de 96 pocillos se reviste con 50 µl de miostatina humana recombinante (R&D systems, libre de vehículo, se vuelve a suspender primero en HCl 4 mM y a continuación se reviste a 1 µg/ml en tampón de carbonato, pH 9,6) o 50 µl de GDF-11 humano recombinante (Peprotech, Inc., N° de Cat. 120-11, libre de vehículo, se vuelve a suspender primero en HCl 4 mM y a continuación se reviste a 1 µg/ml en tampón de carbonato, pH 9,6). Las placas se incuban a 4 °C durante una noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con PBST (PBS + Tween-20 al 0,1 %). Las placas se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo por pocillo (BSA al 1 % en PBST
15 durante 1 hora).

Los Fab de extractos periplásmicos a someter a ensayo se diluyen en serie en PBST. Se añaden cincuenta microlitros de cada solución de Fab a las columnas de placas revestidas con GDF-8 y GDF-11. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con PBST.

20 Se añade anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (50 µl de AP kappa anti-ratón de cabra (Southern Biotech), diluido a 1:1000 en PBST) a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con PBST. Se añaden cincuenta microlitros de sustrato cromogénico (AMP/PMP) a cada pocillo y se deja que se desarrolle a temperatura ambiente. La absorbancia de los pocillos se lee a DO de 560 nm. Para cada Fab se obtiene una curva de valoración a la DO relativa en el punto medio de la curva de Fab de referencia informada.

25 Estos datos demuestran que todos los Fab sometidos a ensayo se unen a miostatina madura humana unida a placa con una reactividad cruzada hacia GDF11.

B. ELISA de Captura de Fab

30 Una placa de 96 pocillos se reviste con 50 µl de anticuerpo kappa anti-humano de cabra a 2 µg por ml en tampón de bicarbonato. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con PBST (PBS + Tween al 0,1 %). Las placas se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo por pocillo (BSA al 1 % en PBST durante 1 hora).

35 Los Fab de extractos periplásmicos a someter a ensayos se capturan en columnas en las placas durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar 3 veces con PBST, se añaden 50 µl de diluciones con un índice de dilución de 2 de Miostatina biotinilada (de 100 nM a 780 pM) a cada columna de los Fab capturados y se incuba durante 1 hora a 37 °C. La placa se lava a continuación con PBST y se incuba con PBST a 37 grados C durante 1-3 horas.

40 Se añade Neutravidina conjugada con fosfatasa alcalina (Pierce, diluida a 1:1000 en PBST) a cada cuchillo y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación los pocillos se lavan 3 veces con PBST. Se añaden 50 µl de sustrato cromogénico (AMP/PMP) a cada pocillo y se permite que desarrolle a temperatura ambiente. La absorbancia de los pocillos se lee a una DO de 560 nm. Y se informa la DO relativa en comparación con la DO máxima para el Fab de referencia.

Todos los Fab de la invención sometieron a ensayo la unión de miostatina madura humana soluble.

Ejemplo 2 Ensayo de Neutralización de Miostatina

45 Se retiran explantes ectodérmicos de embriones de Xenopus en el estadio de 8-9 blástulas mediante procedimientos convencionales y se cultivan en 0,5X de MBS (1X de MBS: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,7 mM, MgSO₄ 1 mM, HEPES 5 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, gentamicina a 1:1000 en v/v, albúmina de suero bovino al 0,1 %) con la adición de factor de crecimiento (GDF8 o GDF11) más o indicado, durante 18 horas a 18 °C, momento hacia el que el control de los embriones alcanza la etapa de neurula temprana (estadio 15-16). Los explantes se fotografian y se mide la longitud de cada explante usando un algoritmo para análisis de imágenes diseñado para cuantificación de protección animal. Los explantes no tratados ni con factor de crecimiento ni Fab (controles), se redondean en bolas de
50 epidermis. La miostatina y GDF-11 inducen mesodermo en estos explantes ectodérmicos que hacen que los explantes se alarguen y formen estructuras de tipo mancuerna. Se añaden anticuerpos o Fab, cuando se someten a ensayo para actividad de neutralización, al medio de cultivo que contiene miostatina para toda la duración del periodo de cultivo y se evalúa su capacidad para inhibir movimientos de elongación inducidos por factor de crecimiento. Se añade miostatina a los explantes a 25 ng/ml. Se añaden anticuerpos o Fab a someter a ensayo a 20

µg/ml. Como control se usa un Fab generado para un antígeno irrelevante. Un anticuerpo GDF8 de anti-ratón monoclonal disponible en el mercado se puede someter a ensayo como un control, este anticuerpo se produce en cabras inmunizadas con GDF8 de ratón purificado y el fabricante demuestra que neutraliza la elongación de protecciones animales de *Xenopus* provocadas con 25 ng/ml de GDF8 murino cuando está presente aproximadamente 10-20 µg/ml (R&D Systems N° de Cat. MAB788).

Para el procesamiento de imágenes se usa ImagePro (v4.5.1.22, de Media Cybernetics). Se escribe una macro para automatizar el procesamiento de imágenes. La macro procesa la imagen y registra la longitud en unidades de bits. Se pueden usar procedimientos de medida alternativos como se conoce en la técnica. Se contempla que los anticuerpos de la invención neutralizan la actividad de GDF8 en el ensayo de protección animal.

Ejemplo 3: Medidas de Afinidad de los Fab

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

La recogida de datos cinéticos de unión se realiza en caudal máximo (100 µl/min). Cada ciclo de análisis consiste en (i) inyección de 250 µl de un Fab (intervalo de concentraciones de 50 nM a 0,4 nM en incrementos de dilución de 2 veces) sobre todas las células de flujo 4 con la célula de flujo 1 como la célula de referencia, (ii) 20 min de disociación (flujo de tampón), (iii) regeneración de la superficie de GDF-8 o GDF-11 con dos inyecciones de 15 µl de glicina 10 mM, pH 1,5, (iv) una inyección de blanco de 15 µl de tampón de desarrollo, y (v) un período de estabilización de 2 min antes de comenzar el ciclo siguiente. La señal se controla como célula de flujo 2 menos célula de flujo 1, célula de flujo 3 menos célula de flujo 1 y célula de flujo 4 menos célula de flujo 1. Las muestras y un blanco de tampón se inyectan por duplicado en un orden aleatorio. Los datos se procesan usando el software SCRUBBER (Centro de Análisis de Interacción Biomolecular, Univ. de Utah). Las tasas de asociación y disociación para cada ciclo se determinan ajustando los datos del biosensor que usa un modelo de asociación sencilla usando ClampXP (Centro de Análisis de Interacción Biomolecular, Univ. de Utah) para extraer las constantes de tasa de k_{on} y k_{off} , la constante de unión en equilibrio K_d se calcula usando la relación $K_d = k_{off}/k_{on}$. Los Fabs 41-1 y 412-6, cuando se miden en el ensayo anterior, presentan afinidades para GDF-8 de 4,16 nM ($4,16 \times 10^{-9}$ M) y 0,46 nM ($4,6 \times 10^{-10}$ M) respectivamente, y presentaban afinidades para GDF-11 de 8,96 nM y 0,81 nM respectivamente; la especificidad relativa para ambos Fab presentar una preferencia de aproximadamente 2 veces para GDF-8 con respecto a GDF-11. (Tabla 2)

Tabla 2

Fab	GDF-8			GDF-11		
	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-6}$)	k_{off} (s^{-1}) ($\times 10^3$)	K_d (nM) calc	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-6}$)	k_{off} (s^{-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

Ejemplo 4: Medidas de Afinidad de los Mab

Las medidas de afinidad de unión para anticuerpos monoclonales de longitud completa de la invención se determinan usando un ensayo de KINEXA de Sapidyn. Perlas de sepharose de flujo rápido activadas con NHS (GE Healthcare) se revisten previamente con un anticuerpo de la invención (50 µg de anticuerpo anti-miostatina por ml de perlas) y se bloquean con 10 mg/ml de BSA en Tris-HCl 1 M, pH 8,0. A continuación se incuban 2 pM, 4 pM, 40 pM de un anticuerpo de la invención por ejemplo, 3-74/C1E4) con varias concentraciones (por ejemplo, diluciones en serie de 2,4 pM a 10 nM) de miostatina en tampón de desarrollo (PBS, Tween-20 al 0,005 % (v/v) y 1 mg/ml de ovalbúmina) durante 10 horas a temperatura ambiente. Para determinar el anticuerpo libre presente en equilibrio, cada muestra se pasa a través de las perlas revestidas con miostatina. La cantidad de anticuerpo unido a perla se cuantifica a continuación pasando una solución de anticuerpo Fc anti-humano de cabra marcado con fluorescencia

(Cy5) (Jackson Immuno Research) diluido a 1:4000 en tampón de desarrollo sobre las perlas. La señal de fluorescencia medida es proporcional a la concentración de anticuerpo libre en equilibrio. Cada concentración de miostatina se mide por duplicado. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se obtiene a partir de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio, de curva múltiple (software KINEXA).

La constante de la tasa de asociación (k_{on}) para la unión de GDF-8 también se determina usando un ensayo KINEXA de Sapidyn. Se mezclan dos pM de anticuerpo con GDF-8 20 pM usando las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. En diversos puntos temporales, las muestras se investigan para anticuerpo libre usando las condiciones que se han descrito anteriormente para la unión en equilibrio, la continuación la dependencia del tiempo resultante se ajusta usando el software KINEXA para determinar la tasa de asociación (k_{on}). La constante de la tasa de disociación (k_{off}) se calcula usando la expresión $k_{off} = K_D \times k_{on}$. Cuando se midió el anticuerpo monoclonal de longitud completa 3-74/C1E4 (unido de forma operativa a una región de Fc de IgG₄) usando el ensayo descrito, los resultados obtenidos se indican a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

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

Ejemplo 5 Ensayo Indicador de Miostatina/SBE

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

Se contempla que un Ensayo Indicador de Miostatina/SBE no se limita a las condiciones exactas que se describen en el presente documento, y se pueden usar otros tipos de células, por ejemplo, 293HEK (ATCC) o células de Rhabdomyosarcoma A204 (véase, por ejemplo, Whittemore, y col. BBRC, 200: 965-7.1, 2003); se pueden usar otros tipos de indicadores, por ejemplo, CAT, β -gal, GFP, y se pueden usar otras condiciones de crecimiento para las células y condiciones de ensayo que incluyen cantidades variables de miostatina en la reacción. Un experto en la materia será capaz rápidamente de discernir si un ensayo entra dentro del alcance de un ensayo indicador de miostatina/SBE para el que tendría un vector que comprende un elemento de SBE secuencia arriba de un gen indicado introducido en una célula huésped, en el que el elemento de SBE usado es sensible al SMAD producido como respuesta a la miostatina que se une al receptor de miostatina. R.S. Thies, y col., Growth Factors, 18: 251-259, 2001, describe un ensayo similar mientras que, Wittemore, L. y col., BBRC, 300: 965-971, 2003 describen la respuesta del elemento de SBE al SMAD producido como respuesta a la miostatina que se une a su receptor.

En este ensayo, se cultivan células 293E (Edge Biosystems) en un matraz T-75 en medios DMEM/F12 media (1:1) (Gibco 10565-042) y FBS al 10 %. Las células se transfectan con una mezcla de 100 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-019), 5 ml de OptiMEM I (Gibco 51985-034) y 30 μ g de ADN de SB-luciferasa durante 4 horas a 37 °C. La mezcla de transfección y se añade medio completo durante 1 hora a 37 °C. A continuación las células se tripsinizan y se vuelven a suspender en medio completo a 2×10^6 células/ml y se siembran 50 μ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de Biocoat (BD 35-6461) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de completar la incubación, el medio se reemplaza con 100 μ l de cada Fab a someter a ensayo que se diluye en serie a 1:2 y se incubaba previamente durante 1 hora a 37 °C con una solución a 1:1 de 40 ng/ml de miostatina (R&D Systems 788-G8) o GDF-11 (R&D Systems) en medio completo.

La placa se deja durante una noche a 37 °C, CO₂ al 5 % y al día siguiente se añaden 100 μ l de una mezcla a 1:1 de Tampón de Lisis Glo y reactivo de Luciferasa Bright-Glo (Promega) a cada pocillo y se mezclan mediante pipeteo. A partir de esta mezcla, se transfieren 150 μ l a una placa de 96 pocillos de fondo blanco y se mide la luminiscencia usando un luminómetro. A continuación se representa la luminiscencia frente a la concentración de Fab y se calcula la CI₅₀ para cada Fab para miostatina y GDF-11.

Los Fab sometidos a ensayo usando las condiciones que se han descrito anteriormente proporcionan valores de CI₅₀ como se enumeran en la Tabla 4 dada a continuación.

Tabla 4

Fab	Cl ₅₀ GDF-8	Cl 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

Ejemplo 6 Farmacocinética

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

Ejemplo 7 Efecto *in vivo* en la Masa y Fuerza Muscular

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

Se pesan ratones SCID/CB17 macho (Taconic Biotechnology) y se distribuyen en grupos de diez. Un anticuerpo de la invención (41C1E4) en tampón PBS se inyecta por vía subcutánea en los ratones a diversas dosis (10, 5 y 2 mg/kg) los días 0 y 7. En un grupo de control, se inyecta IgG por vía subcutánea a 10 mg/kg en los ratones en los días 0 y 7. En el día 14, la fuerza muscular, la fuerza de las extremidades delanteras se miden con un medidor de ensayo de fuerza de agarre (por ejemplo, el modelo 1027 csx, Columbus Instruments). Los animales se sacrifican y se evalúa la masa muscular por resonancia magnética nuclear (RMN). El peso de los músculos gastrocnemio y cuádriceps también se mide así como el peso corporal. Los resultados, medias y errores estándar para los diversos parámetros, son como se muestra en la Tabla 5 dada a continuación. Los datos se transforman mediante un procedimiento de transformación de Box Cox para normalizar los datos. Los valores atípicos para cada parámetro se identifican por medios estadísticos con el software 5.1 de JMP (SAS, Inc.) y se excluyen del conjunto de datos. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA y un ensayo de t de Student. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo. El anticuerpo sometido a ensayo a 5 mg/kg y 10 mg/kg da como resultado resultados estadísticamente significativos con respecto al grupo de IgG de control para todos los parámetros sometidos a ensayo. El anticuerpo sometido a ensayo a 2 mg/kg da como resultado resultados estadísticamente significativos con respecto al grupo de IgG de control para los parámetros de RMN del Músculo, peso del cuádriceps en húmedo y peso del gastrocnemio en húmedo.

Tabla 5

Grupo de Estudio	PC Inicial (g)	PC Final (g)	RMN del Músculo (g)	Peso del Cuádriceps en húmedo (mg)	Peso del Gastrocnemio en húmedo (mg)	Fuerza de agarre (Newtons)
IgG de Control	19,82 ± 0,35	20,89 ± 0,33	15,17 ± 0,27	159,92 ± 4,13	92,84 ± 1,99	2,89 ± 0,08
mg/kg de 41C1E4 2	19,92 ± 0,32	21,78 ± 0,22	16,27 ± 0,13	172,07 ± 1,53	102,13 ± 0,88	2,99 ± 0,07
mg/kg de 41C1E4 25	19,94 ± 0,34	21,9 ± 0,37	16,54 ± 0,39	185,27 ± 4,66	108,16 ± 2,3	3,23 ± 0,04

(continuación)

Grupo de Estudio	PC Inicial (g)	PC Final (g)	RMN del Músculo (g)	Peso del Cuádriceps en húmedo (mg)	Peso del Gastrocnemio en húmedo (mg)	Fuerza de agarre (Newtons)
mg/kg de 41C1E4 10	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						

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> ELI LILLY AND COMPANY
	<120> Anticuerpos anti-miostatina
	<130> X-17251
10	<140> US 60/725.738
	<141> 12-10-2005
	<160> 158
15	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
	<211> 375
20	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<400> 1

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

Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
180 185 190

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
195 200 205

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
210 215 220

Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
225 230 235 240

Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
245 250 255

Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
260 265 270

Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
275 280 285

Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
290 295 300

Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
305 310 315 320

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
325 330 335

Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
340 345 350

Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
355 360 365

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
370 375

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

<400> 2

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15

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

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

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <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
 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
 35 40 45
 Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
 50 55 60
 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 65 70 75 80
 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
 85 90 95
 Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105

<210> 5
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 5

gaggtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggaggggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggact cactttcagt aggtatggca tgtcttgggt tgcgcagact 120
 ccggagagga ggctggagtg ggtcgcagcc attaatagtc atggtggtag cacctactat 180
 tcagacactg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaataa acagtctgag gtctgaggac acagccttgt attactgtgc aagacttccg 300
 gactactggg gccaaaggcac cacggtcacc gtttcctca 339

<210> 6
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

gaaaatgtgc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60

atgacctgca gggccagctc aagtgtgaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag 120
tcagggtgctt cccccaaact ctggatctat agcacatcca acttggtctt tggagtcctt 180
gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagtgtggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtacagtg gttaccactt cacgttcggc 300
tcggggacca agctggaaat gaaa 324

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética
<400> 7

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
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
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

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética
<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

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
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

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

<400> 9

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 11

Arg Ala Leu Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

5 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X es S o L
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es S o Q
 20 <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>
 <223> construcción sintética
 30 <400> 13
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 35 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 14
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala
 1 5
 45 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Construcción sintética
 55 <400> 15
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr
 1 5

5	<p><210> 16 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial</p>	
10	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 16</p>	<p>Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asn 1 5 .</p>
15	<p><210> 17 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial</p>	
20	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 17</p>	<p>Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asp 1 5 .</p>
25	<p><210> 18 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial</p>	
30	<p><220> <223> construcción sintética</p> <p><400> 18</p>	
35		<p>Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala 1 5</p>
40	<p><210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial</p>	
45	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 19</p>	<p>Ser Thr Ser Asn Leu Val Phe 1 5 .</p>
50	<p><210> 20 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial</p>	
55	<p><220> <223> Construcción sintética</p>	

	<400> 20	
5		Ser Thr Ser Asn Leu Thr Trp 1 5
10	<210> 21 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética <400> 21	
20		Ser Thr Ser Asn Leu Met Asp 1 5
25	<210> 22 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Construcción sintética <400> 22	
30		Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr 1 5
35	<210> 23 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Construcción sintética <400> 23	
40		Ser Thr Ser Asn Leu Val Trp 1 5
45	<210> 24 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 24	
	Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr	
	1 5	

5	<p><210> 25 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
10	<p><220> <223> construcción sintética</p> <p><400> 25</p>
	<p>Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr 1 5</p>
15	<p><210> 26 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
20	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 26</p>
25	<p>Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr 1 5</p>
30	<p><210> 27 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
35	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 27</p>
	<p>Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Phe Phe Thr 1 5</p>
40	<p><210> 28 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
45	<p><220> <223> Construcción sintética</p> <p><400> 28</p>
50	<p>Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln Phe Thr 1 5</p>
55	<p><210> 29 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial</p>
	<p><220> <223> Construcción sintética</p>

<400> 29

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
1 5

5 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> construcción sintética

<400> 30

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
1 5

15 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 31

Gln Leu Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

30 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 32

Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

40 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

50 <400> 33

Gln His Tyr Leu Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 34
<211> 9

	<212> PRT
	<213> Artificial
5	<220>
	<223> Construcción sintética
	<400> 34
	Gln His His Ser Gly Tyr His Phe Thr
	1 5
10	<210> 35
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Artificial
15	<220>
	<223> Construcción sintética
	<400> 35
20	Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Trp Thr
	1 5
	<210> 36
	<211> 9
25	<212> PRT
	<213> Artificial
	<220>
	<223> Construcción sintética
30	<400> 36
	Gln Trp Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
	1 5
35	<210> 37
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Artificial
40	<220>
	<223> Construcción sintética
	<220>
45	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2)..(2)
	<223> X es Q, N, H, L, P o W
	<220>
50	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3)..(3)
	<223> X es Y o H
	<220>
55	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4)..(4)
	<223> X es S o L
	<220>
	<221> MISC_FEATURE

	<222> (7)..(7) <223> X es H, F, Q o T	
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (8)..(8) <223> X es F o W	
10	<400> 37	
		Gln Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Thr 1 5
15	<210> 38 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus</i> sp.	
	<400> 38	
20		Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser 1 5 10
25	<210> 39 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> construcción sintética	
30	<400> 39	
		Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Thr Met Ser 1 5 10
35	<210> 40 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
40	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 40	
		Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Pro Met Ser 1 5 10
45	<210> 41 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
50	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 41	
55		Gly Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser 1 5 10

5
 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X es T o N
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X es G, T o P
 <400> 42
 Gly Leu Xaa Phe Ser Arg Tyr Xaa Met Ser
 1 5 10
 20
 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.
 25
 <400> 43
 Ala Ile Asn Ser His Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 30
 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 44
 40
 Ala Ile Asn Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 45
 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 50
 <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
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética

<400> 46

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

Gly

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 47

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

Gly

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 48

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

Gly

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 49

Ala Ile Asn Ser Met Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> construcción sintética

<400> 50

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

Gly

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 51

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

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 52

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
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 53

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
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética

<400> 54

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
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 55

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

Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 56

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

Gly

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 57

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

Gly

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 61

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

Gly

5 <210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> construcción sintética

<400> 62

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

Gly

15 <210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 63

Arg Ile Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 64

His Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 65

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

Gly

5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 66

15

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

Gly

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> construcción sintética

25

<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

35

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 68

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

Gly

40

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 69

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

Gly

5

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética

15

<400> 70

Ala Gln Thr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> Construcción sintética

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X es A, R o H

35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X es I o Q

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es N, T o K

45

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es S o A

50

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X es H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I o E

55

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X es G o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X es Y o K
 5
 <400> 71

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

 Gly
 10
 <210> 72
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.
 15
 <400> 72

 Leu Pro Asp Tyr
 1

 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20

 <220>
 <223> Construcción sintética
 25
 <400> 73

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

 Gly
 30
 <210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 74
 40

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

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

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

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<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

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

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

5

10

10

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 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

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

15

20

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 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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

<210> 79
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 79

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 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
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

10

<210> 80

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<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
 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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> 82
 <211> 108

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 82

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 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
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

10 <210> 83
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

20 <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
 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<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
 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
 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

<210> 85
 <211> 108

<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética
<400> 85

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 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
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

10

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Construcción sintética
<400> 86

20

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 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

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
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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

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
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

<210> 88
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 88

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 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
 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

5 <210> 89
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 89

15

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 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 Tyr Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 90
 <211> 108

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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
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> 91
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 91

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
 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<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
 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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

<210> 94
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 94

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 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
 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
 <211> 108

<212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> construcción sintética
 <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

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

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

10

<210> 96
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

20

<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
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

<210> 97
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 97

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 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

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
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
 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
 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
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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

<210> 100
 <211> 108

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 100

```

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 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 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
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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
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
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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
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

<210> 103
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 103

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
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
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> 104
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética

<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
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
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> 105
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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 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

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

Ser

<210> 106
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
 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
 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

Ser

<210> 107
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 107

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
 Ser Ala Ile Asn Ser Ile 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

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

Ser

<210> 108
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 108

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

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
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
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 109

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
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
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
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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
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
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<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
 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
 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
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

20

<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
 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
 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> 113
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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> 114
 <211> 113

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 114

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

10 <210> 115
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

20 <400> 115

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

<210> 116
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 116

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

<210> 117
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 117

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
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

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

Ser

<210> 118

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 118

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

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

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> 119
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 119

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

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

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> 120
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 120

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
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

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> 121

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 121

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

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

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

Ser

<210> 122
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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

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

Ser

<210> 123
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 123

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
 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
 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

5

<210> 124
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> construcción sintética
 <400> 124

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 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
 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
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
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 125

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

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
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
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
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
85 90 95
Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

5

<210> 127
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética
<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
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
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
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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

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
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> 129
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
 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
 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> 130
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 130

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
 Ser Ala Ile Lys Ala 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
 85 90 95

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

Ser

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 131

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

Ser Ala Ile Lys Ser Ser Gly Ser 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 Glu 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> 132
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética

<400> 132

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

Ser

<210> 133
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 133

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
 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

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

Ser

<210> 134
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética
<400> 134

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

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

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> 135
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética
<400> 135

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
 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
 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> 136
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<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
 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
 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> 137
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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 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

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> 138
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<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
 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
 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
 100 105 110
 Ser

<210> 139
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 139

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

<210> 140
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 140

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
 65 70 75 80
 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> 141
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 141

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

<210> 142
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 142

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

<210> 143
 <211> 23
 <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

<210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 144

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
 <213> *Homo sapiens*

<400> 145

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly 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 25 30

5
 <210> 146
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 146

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

10
 <210> 147
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 147

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

20
 <210> 148
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 148

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
 20 25

30
 <210> 149
 <211> 25
 <212> PRT
 <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 25

35
 <210> 150
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <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

<210> 151
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 151
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 10
 <210> 152
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 152
 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
 20
 <210> 153
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 153
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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
 30
 <210> 154
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 40 <223> X es A, V, T o M
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 45 <223> X es S, A, T, N, W, D o Y
 <400> 154
 Ser Thr Ser Asn Leu Xaa Xaa
 1 5

5
 <210> 155
 <211> 106
 <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
 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
 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
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10
 <210> 156
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 156

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 60
 gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag 120
 gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 180
 gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac 240
 aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc 300
 aacaggggag agtgc 315

20
 <210> 157
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 157

gtggctgcac catctgtctt catcttcccc ccattctgatg agcagttgaa atctggaact 60
gcctctgttg tgtgcctgct gaataaattc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag 120
gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 180
gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac 240
aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc 300
aacaggggag agtgc 315

<210> 158
<211> 970
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 158

ggcccatcgg tcttccccgt agcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 60
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 120
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 180
gtcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa 240
cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatggtcc 300
cccatgccca ccctgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc 360
cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacgt gcgtggtggt 420
ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt 480
gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag 540
cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggcttc 600
caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg 660
agagccacag gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag 720
cctgacctgc ctggtcaaag gtttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa 780
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt 840
cttctcttac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc 900
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc 960
tctgggttga 970

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de miostatina que comprende un polipéptido de la región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 98 y un polipéptido de la región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 138.
- 5 2. Un anticuerpo de miostatina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD.
3. Un anticuerpo de miostatina de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la región constante presente en el anticuerpo se origina a partir del genoma de un animal seleccionado entre animales domésticos, animales para deportes y animales fuente de alimento.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende, adicionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un anticuerpo de miostatina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5 para uso como un medicamento.
- 15 7. Un anticuerpo de miostatina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5 para uso en tratamiento o prevención de una o más afecciones seleccionadas entre debilidad, caquexia, atrofia muscular, debilidad muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, EPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, diabetes de tipo II o síndrome metabólico.

20

FIG. 1 Promiostatina

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

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

1	DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA	40
41	<u>NYCSGECEFV</u> <u>FLQKYPHTL</u> <u>VHQA</u> NPRGSA GPCCTPTKMS	80
81	PINMLYFNGK EQIIYGKIPA MVDRCGCS 109 (SEC ID N°: 2)	

FIG. 3 Miostatina Madura

		58
pollo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTH	
perro	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTH	
caballo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTH	
oveja	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTH	
vaca	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTH	
cerdo	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTH	
		109
pollo	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	SEC ID 2
perro	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
caballo	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
oveja	LVHQA NPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS	3
vaca	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGEGQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2
cerdo	LVHQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	2

FIG. 4 Miostatina: Homología con GDF-11

Miostatina	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK	
GDF-11	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK	
Miostatina	<u>ANYCSGECEFVFLQKYPHTL</u> <u>VHQA</u> NPRGSAGPCCTPTK	
GDF-11	ANYCSGQCEYMFQKYPHTLVQA NPRGSAGPCCTPTK	
Miostatina	MSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	(SEC ID N°: 2)
GDF-11	MSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS	(SEC ID N°: 4)

FIG. 5 Anticuerpo Precursor

ADN de HCVR de YN41

5' - GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTC
CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACTTTCAGTAGGTATGGCA
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAGGAGGCTGGAGTGGGTCCGAGCC
ATTAATAGTCATGGTGGTAGCACCTACTATTGAGACACTGTGAAGGGCCG
ATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGA
ACAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGACTTCCG
GACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTTTCCTCA (SEC ID N°: 5)

Aminoácidos de HCVR de YN41

EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGLTFS RYGMSWVRQT PERRLEWVAA
INSHGGSTYY SDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARLP
DYWGQGTVT VSS (SEC ID N°: 7)

ADN de LCVR (Kappa) de YN41

5' - GAAAATGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA
AAAGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACT
TGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAAACCTCTGGATCTAT
AGCACATCCAACCTTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATG
CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCACTTCACGTTCCGC
TCGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA (SEC ID N°: 6)

Aminoácidos de LCVR (Kappa) de YN41

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

FIG. 6 Alineación de CDR de Cadena Ligera

	CDR1	SEC ID Nº:	CDR2	SEC ID Nº:	CDR3	SEC ID Nº:
YN41	RASSSVSSSYLH	9	STSNLAS	13	QQYSGYHFT	24
41-1	RASQSVSSSYLH	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	RASSSVSSSYLH	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	STSNLVA	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 Continuación

41H-D6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-D11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E5	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E7	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E9	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F10	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
41C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHHSGYHFT	34
41C1C1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHWT	35
41C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHFT	34
41C2A1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHWT	35
41C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHWT	36
41C2E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHWT	35
41C2G8	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
3-74/C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
3-74/C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHHSGYHFT	34
3-74/C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
3-74/C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHWT	36
Consenso	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 o L		X ₆ :A, V, T o M		X ₂ :Q, N, H, L, P o W	
	X ₄ :S o Q		X ₇ :S, A, T, N, W, D o Y		X ₃ :Y o H	
					X ₄ :S o L	
					X ₇ :H, F, Q o T	
					X ₈ :F o W	

FIG. 7 Alineación de CDR de Cadena Pesada

Fab	CDR1	SEC ID Nº:	CDR2	SEC ID Nº:	CDR3	SEC ID Nº:
YN41	GLTFSRYGMS	38	AINSHGGSTYYSDTVKG	43	LPDY	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	AINSSGGSTYYSDTVKG	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	AINSAGGSTYYSDTVKG	56	LPDY	72
411-10	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
411-11	GLTFSRYGMS	38	AINSDGGSTYYSDTVKG	57	LPDY	72
411-12	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	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	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41H-E4	GLTFSRYGMS	38	HIKSSGGSTYYSDTVKG	64	LPDY	72
41-E5	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTKYSDTVKG	65	LPDY	72

FIG 7 Continuación

41H-E7	GLTFSRYGMS	38	AIKASGGSTYYSDTVKG	66	LPDY	72
41H-E9	GLTFSRYGMS	38	AIKSSGGSTYYSDTVKG	67	LPDY	72
41H-E12	GLTFSRYGMS	38	AIKSLGGSTYYSDTVKG	68	LPDY	72
41H-F10	GLTFSRYGMS	38	AITSMGGSTYYSDTVKG	69	LPDY	72
41H-F12	GLTFSRYGMS	38	AQTSSGGSTYYSDTVKG	70	LPDY	72
41C1A2	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1A4	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1C1	GLTFSRYPMS	40	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C1E4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A1	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2E4	GLTFSRYPMS	40	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C2G8	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A2	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A4	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1E4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
3-74/C2A4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
Consenso	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 o N		X ₁ : A, R o H			
	X ₈ : G, T o P		X ₂ : I o Q			
			X ₃ : N, T o K			
			X ₄ : S o A			
			X ₅ : H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I o E			
			X ₇ : G o S			
			X ₁₀ : Y o K			

FIG. 8

Constante Kappa (SEC ID N°: 155)

VAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADN Constante Kappa (SEC ID N°: 156)

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGTC

IgG4S->P Delta K (SEC ID N°: 157)

GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVFPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

ADN de IgG4S -> P Delta K (SEC ID N°: 158)

GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
GCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCC
CCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTCTGTTCCC
CCCAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCTGGGTGA

FIG. 9 Alineaciones de Secuencias de Cadena Ligera

[illegible]

FIG. 9 Continuación

	CDR1	CDR2	CDR3	SEC ID N°:
41L3-F12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			98
41L3-G2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			99
41L3-G6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			100
41H-A7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-B8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-D6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-D11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E9	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-E12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-F10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41H-F12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			89
41CIA2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			96
41CIA4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			101
41C1C1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			99
41C1E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			98
41C2A1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			99
41C2A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			141
41C2E4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			102
41C2G8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			96
3-74/C1A2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			95
3-74/C1A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			140
3-74/C1B4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			98
3-74/C2A4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVSSSYLHWYQKPKQAPRLIYSTSNLVAGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTCQHSYGNYHTFGGGTKVEIK			142
L-FR1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC			SEC ID N°: 143
L-FR2	WYAAKFGQAPRLIY			SEC ID N°: 144
L-FR3	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYTC			SEC ID N°: 145
L-FR4	FGGGTKVEIK			SEC ID N°: 146
L-FR4B	FGGGTKLEIK			SEC ID N°: 147

FIG. 10 Alineaciones de Secuencias de Cadena Pesada

[illegible]

FIG. 10 Continuación

	CDR1	CDR2	CDR3	SEC ID N°:
41L2-E9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	120.
41L3-F12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	120
41L3-G2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	120
41L2-G6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	120
41H-A7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	123
41H-B8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	124
41H-D6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	125
41H-D11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	126
41H-E11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	127
41H-E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	128
41-E5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	129
41H-E7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	130
41H-E9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	131
41H-E12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	132
41H-F10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	133
41H-F12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	134
41C1A2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	135
41C1A4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	135
41C1C1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	136
41C1E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	123
41C2A1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	123
41C2A4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	123
41C2G8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	136
3-74/C1A2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	137
3-74/C1A4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	137
3-74/C1E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	138
3-74/C2A4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLWWSAI	TSGGSTYYSDTVKGRFTISRDN	138
H-FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS			(SEC ID N°: 148)
H-FR1B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS			(SEC ID N°: 149)
H-FR2	WVRQAPGKGLWWS			(SEC ID N°: 150)
H-FR2B	WVRQAPGKGLWWS			(SEC ID N°: 151)
H-FR3	RFTISRDNKNTLYLQNSLRAEDTAVYCAR			(SEC ID N°: 152)
H-FR3B	RFTISRDNKNTLYLQNSLRAEDTAVYCAR			(SEC ID N°: 153)
H-FR4	WQGGTLVTVSS			(SEC ID N°: 139)