

(11) Número de Publicação: **PT 1951755 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/22 (2015.01) **A61P 3/00** (2015.01)
A61P 21/00 (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.10.05**

(30) Prioridade(s): **2005.10.12 US 725738 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.08.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.01.07**
052/2015

(73) Titular(es):

ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN
46285 US

(72) Inventor(es):

BRYAN EDWARD JONES US
JULIAN DAVIES US
ANDREW IHOR KORYTKO US
PAMELA JEAN MITCHELL US
ROSAMUND CAROL SMITH US

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-MIOSTATINA**

(57) Resumo:

SÃO IDENTIFICADOS ANTICORPOS ANTI-MIOSTATINA QUE SE CARACTERIZAM COMO POSSUINDO ALTA AFINIDADE E PODEM SER ANTICORPOS QUIMÉRICOS, HUMANIZADOS OU TOTALMENTE HUMANOS, IMUNOCONJUGADOS DOS ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DESTES. OS ANTICORPOS DO INVENTO SÃO ÚTEIS PARA AUMENTO DA MASSA MUSCULAR, AUMENTANDO A DENSIDADE ÓSSEA OU PARA O TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS EM ESPÉCIES DE MAMÍFERO OU DE AVES.

RESUMO**"ANTICORPOS ANTI-MIOSTATINA"**

São identificados anticorpos anti-miostatina que se caracterizam como possuindo alta afinidade e podem ser anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, imunoconjugados dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes. Os anticorpos do invento são úteis para aumento da massa muscular, aumentando a densidade óssea ou para o tratamento de vários distúrbios em espécies de mamífero ou de aves.

DESCRIÇÃO**"ANTICORPOS ANTI-MIOSTATINA"****CAMPO DO INVENTO**

O invento está no campo da medicina, particularmente no campo dos anticorpos monoclonais contra miostatina. Mais especificamente, o invento refere-se a anticorpos anti-miostatina quiméricos ou humanizados de elevada afinidade e à utilização dos anticorpos para terapia, profilaxia ou diagnóstico de vários distúrbios ou condições em espécies de mamífero ou de ave.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Os membros da superfamília de proteínas factor de crescimento transformante beta (TGF- β) estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e na homeostasia dos tecidos adultos. Os membros da superfamília de TGF- β partilham uma estrutura comum, incluindo um péptido de sequência sinal necessário para a secreção da proteína e um fragmento amino-terminal que é clivado proteoliticamente a cerca de 105-140 aminoácidos do terminal carboxilo da proteína precursora grande para produzir a proteína madura. A proteína madura é caracterizada por resíduos de cisteína altamente conservados, enquanto a forma activa da proteína

madura é um homodímero ligado por dissulfureto da pró-proteína clivada proteoliticamente (Gray, A., e Maston, A., *Science*, 247: 1328, 1990).

A miostatina, também referida como factor de diferenciação do crescimento-8 (GDF-8) é um membro da superfamília de proteínas TGF- β . A miostatina partilha semelhanças estruturais com outros membros da família TGF- β . Ela contém um terminal amino hidrófobo que actua como um sinal de secreção e um domínio RSRR conservado que é importante para o processamento proteolítico. A clivagem da proteína dá origem a um péptido associado a latência amino-terminal e um péptido de sinalização maduro carboxi-terminal que forma o homodímero biologicamente activo. A miostatina é expressa grandemente no músculo esquelético em desenvolvimento e adulto e funciona como um regulador negativo do músculo esquelético. A sobre-expressão sistémica da miostatina em ratinhos adultos conduz a perda de massa muscular (Zimmers, et al., *Science*, 296: 1486-1488, 2002), embora, inversamente, um ratinho knock-out para miostatina seja caracterizado por hipertrofia e hiperplasia do músculo esquelético, resultando em duas a três vezes mais massa muscular do que os seus companheiros de ninhada de tipo selvagem e uma diminuição na acumulação de gordura (McPherron et al. *Nature*, 387: 83-90, 1997). Um humano com uma mutação knock-out para miostatina foi relatado como estando associado a hipertrofia muscular grosseira (Scheulke, et al., *New Eng. J. Med.* 350: 2682, 2004).

Existem presentemente tratamentos limitados disponíveis para perda muscular ou para distúrbios ou condições que beneficiariam de um aumento na massa muscular e/ou força muscular incluindo, por exemplo, distrofia muscular, fragilidade, atrofia por desuso e, caquexia, bem como distúrbios que estão associados a perda muscular, por exemplo, doença renal, insuficiência ou doença cardíaca, e doença do fígado. Devido ao seu papel como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético, a miostatina é um alvo desejável para intervenção terapêutica ou profiláctica de tais distúrbios ou condições ou para monitorizar a progressão de tais distúrbios ou condições. Além do seu papel directo na regulação do músculo esquelético, a miostatina pode também estar envolvida noutras processos fisiológicos, incluindo diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (Kim *et al.* *BBRC*, 281: 902-906, 2001), e, indirectamente com a homeostasia da glicose (McPherron, A. e Lee, S-J. *JCI* 109: 595, 2002) e inibição da formação de osso (Hamrick, M. *Mol. Celular Evol. Biol.* 272: 388-91, 2003; Hamrick *et al.* *Calcif. Tissue Int.* 71: 63, 2002). Consequentemente, antagonistas específicos da miostatina, e.g., anticorpos específicos da miostatina, podem também ser úteis para tratar, prevenir ou monitorizar distúrbios ou condições tais como os que beneficiam do aumento da densidade óssea (e.g., osteoporose), diabetes Tipo II, síndroma metabólica, obesidade e osteoartrite.

A miostatina é altamente conservada entre as

espécies; a sequência de aminoácidos da forma madura da miostatina no humano, ratinho, rato, galinha, peru e vaca é 100% idêntica (ver Figs. 2 e 3). Existem mutações da miostatina de ocorrência natural em gado, que foram associadas a um fenótipo duplo-musculado (McPherron *et al.* *PNAS*, 94: 12457-61, 1997). Uma vez que a miostatina é altamente conservada na sequência e na função ao longo das espécies, um anticorpo anti-miostatina proporciona uma forma promissora de aumentar a massa muscular, ou tratamento ou prevenção de tais distúrbios ou condições listados acima, não só em humanos, como também em outros mamíferos incluindo, *e.g.*, animais domésticos (*e.g.*, caninos e felinos), animais de desporto (*e.g.*, equinos), animais fonte de alimento (*e.g.*, bovinos, suíños e ovinos) e em espécies aviárias (*e.g.*, frango, peru, pato e outras aves de caça e capoeira).

O factor de diferenciação do crescimento-11, também referido como GDF-11 ou BMP-11, é o membro da superfamília de proteínas TGF- β que é mais homólogo à miostatina. A sequência de aminoácidos das formas maduras de miostatina humana e GDF-11 são cerca de 90% idênticas; no entanto, GDF-11 é expresso numa gama mais ampla de tecidos do que é GDF-8, incluindo polpa dentária, cérebro, coração, rim e pulmão, bem como tecido muscular e adiposo (Nakashima *et al.* *Mech. of Development* 80: 185, 1999). Ratinhos *knock-out* para GDF-11 morrem dentro de 24 horas após o nascimento com múltiplas anomalias. Em particular, os ratinhos apresentam pares extra de costelas, falta de

rins e mostram defeitos no estômago, baço e pâncreas (McPherron *et al.*, *Nature Genetics* 22: 260, 1999; Esquela e Lee, *Dev. Biol.* 257: 356, 2003; Harmon *et al.*, *Devpt.* 131: 6163, 2004). Verificou-se recentemente que GDF-11 governa a janela temporal durante a qual os progenitores multipotentes retêm a competência para produzir descendência neural distinta (Kim, J. *et al.* *Science* 308: 1927-1930, 2005).

Existe uma necessidade terapêutica de um anticorpo anti-miostatina que se liga de preferência a miostatina em detrimento de outras proteínas da super-família TGF- β , particularmente GDF-11. Além disso, existe a necessidade de anticorpos específicos de miostatina que se liguem a miostatina com elevada afinidade, particularmente uma afinidade mais elevada (*i.e.* uma afinidade mais forte tal como mostrado por exemplo por um valor de K_D mais baixo), que aquela com que se ligam a GDF-11, e permitam deste modo que o nível de dose que os pacientes recebem seja minimizado o que pode deste modo resultar em dosagens menos frequentes com um tal anticorpo que com um anticorpo que se ligue a miostatina com uma afinidade menor (*i.e.*, uma K_D mais elevada). Um anticorpo de elevada afinidade é também desejável na medida em que pode permitir maior flexibilidade na via de administração do anticorpo a um paciente, uma vez que é menos desejável que um fármaco seja administrado por via intravenosa do que por via subcutânea, por exemplo. Existe também a necessidade de anticorpos específicos de miostatina com um valor de IC_{50} baixo ou de outro modo favorável num ensaio de bioatividade de

miostatina para gerar um anticorpo anti-miostatina terapêutico com uma dose terapêutica eficaz mínima. É também desejável proporcionar anticorpos específicos para miostatina onde qualquer resposta imunitária ao anticorpo evocada por um paciente recebendo o anticorpo é reduzida a um mínimo. O presente invento satisfaz estas necessidades e proporciona vantagens relacionadas.

SUMÁRIO DO INVENTO

Os anticorpos do invento são anticorpos monoclonais anti-miostatina quiméricos ou humanizados e porções de ligação ao抗原 destes, que antagonizam ou neutralizam pelo menos uma actividade biológica *in vitro* ou *in vivo* ou propriedade associada a miostatina ou uma porção desta. Os anticorpos do invento não se ligam a um péptido consistindo nos aminoácidos 40-64 (inclusive), 43-57 ou 45-59 da miostatina madura, de preferência miostatina humana, a níveis significativamente maiores que os do fundo.

De acordo com um primeiro aspecto do presente invento, é proporcionado um anticorpo de miostatina compreendendo um polipéptido da região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 98 e um polipéptido da região variável da cadeia leve SEQ ID NO: 138. De preferência, o anticorpo de miostatina de acordo com o presente invento, compreende ainda uma região constante de cadeia pesada seleccionada a partir de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD. De preferência, no anticorpo de miostatina de acordo com o

presente invento, a região constante presente no anticorpo tem origem no genoma de um animal seleccionado a partir de animais domésticos, animais de desporto e animais fonte de alimento.

De acordo com um segundo aspecto do presente invento, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo de acordo com o presente invento. De preferência, a composição farmacêutica do presente invento comprehende ainda um suporte farmaceuticamente aceitável.

De acordo com um terceiro aspecto do presente invento, é proporcionado um anticorpo de miostatina de acordo com o presente invento ou uma composição farmacêutica de acordo com o presente invento para utilização como medicamento. De preferência, o anticorpo de miostatina ou a composição farmacêutica de acordo com o presente invento é para utilização em tratamento ou prevenção de uma ou mais condições seleccionadas a partir de fragilidade, caquexia, perda muscular, fraqueza muscular, miopatia, distrofia muscular, osteoporose, DPOC, insuficiência ou doença renal, insuficiência ou doença hepática, insuficiência cardíaca, diabetes tipo II ou síndroma metabólica.

Numa forma de realização, os anticorpos do invento possuem uma IC_{50} de menos de 1 nM num ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* (ver Exemplo 5). De preferência, os anticorpos do invento têm um IC_{50} num ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* pelo menos

quatro vezes menor que o IC_{50} do anticorpo num ensaio repórter de GDF-11/SBE *in vitro* (tal como aqui descrito no Exemplo 5).

Numa forma de realização, os anticorpos do invento são caracterizados por uma forte afinidade de ligação (K_D) para miostatina, *i.e.*, menos de cerca de $1,4 \times 10^{-12}$ M. Alternativamente, os anticorpos do invento são caracterizados por uma K_D para miostatina de não mais de $1,4 \times 10^{-12}$ M.

Um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento pode compreender uma região constante de cadeia pesada seleccionada a partir do grupo que consiste em IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD, de preferência IgG₁ ou IgG₄ humana (ou substancialmente de origem humana). Um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento pode compreender ainda uma região constante de cadeia leve capa ou lambda humana. Quando o anticorpo é para utilizar como terapêutico ou preventivo num humano, a região constante é de preferência substancialmente ou inteiramente de origem humana. Quando o anticorpo é para utilizar como terapêutico ou preventivo num animal não humano, ou ovo de um animal não humano, a região constante é de preferência substancialmente originária do animal no qual o anticorpo é para ser utilizado como terapêutico. (ver, *e.g.*, Clarkson, C. *et al.*, *Mol. Imm.* 30: 1195-1204, 1993; número do pedido U.S. 2002/01651350; e números de acesso Genbank X69797, U03778, X16701, X07174, AB016711).

Várias formas do anticorpo estão aqui contempladas. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento pode compreender ou consistir num anticorpo intacto (*i.e.*, inteiro, possuindo uma região Fc intacta), um anticorpo substancialmente intacto, uma porção de ligação ao抗ígeno deste (*e.g.*, Fab, Fab', F(ab')₂) ou um fragmento Fv de cadeia simples. Entenda-se que todas estas formas dos anticorpos estão aqui englobadas e em toda a parte dentro do termo "anticorpo". Além disso, um anticorpo do invento pode ser marcado com um marcador detectável, imobilizado numa fase sólida e/ou conjugado com um composto heterólogo, *e.g.*, uma enzima ou molécula de polietilenoglicol. Além disso, está contemplado que os anticorpos do invento são de origem monoclonal mesmo que possam diferir no padrão de glicosilação.

Noutra forma de realização, o invento proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento. A composição farmacêutica do invento pode ainda compreender um suporte farmacologicamente aceitável. Na referida composição farmacêutica, o anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento é o ingrediente activo. De preferência, a composição farmacêutica compreende uma população homogénea ou substancialmente homogénea de um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento. A composição para utilização terapêutica é estéril e pode ser liofilizada, opcionalmente fornecida com um diluente apropriado.

O invento proporciona um método de inibição de pelo menos uma actividade biológica da miostatina num animal, de preferência uma espécie de mamífero ou de ave, de preferência um humano, a necessitar deste, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz, ou quantidade profilacticamente eficaz, ou quantidade neutralizadora da miostatina ou inibidora da miostatina de um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento à referida espécie de mamífero ou de ave. O invento proporciona ainda um método de aumentar a massa muscular ou o tratamento ou a prevenção de uma doença ou um distúrbio ou uma condição melhorada através da neutralização ou antagonização de uma bioactividade da miostatina que compreende a administração a um paciente (e.g., um humano) a necessitar de tal tratamento ou prevenção, de uma quantidade terapeuticamente ou profilacticamente eficaz de um anticorpo monoclonal do invento.

O invento incorpora um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento para utilização no fabrico de um medicamento para administração a um mamífero, de preferência um humano, para o tratamento de, e.g., fragilidade, caquexia, sarcopenia relacionada com a idade, perda ou fraqueza muscular, miopatia, distrofia muscular, osteoporose, obesidade, DPOC, insuficiência ou doença renal, insuficiência ou doença hepática, insuficiência ou doença cardíaca, síndroma metabólica e diabetes Tipo II num mamífero, preferencialmente um humano, a necessitar deste

através da administração ao referido mamífero de uma quantidade terapeuticamente quantidade eficaz ou profilacticamente eficaz de um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento.

O invento incorpora um artigo de fabrico compreendendo um material de embalagem e um anticorpo do invento contido no referido material de embalagem e em que o material de embalagem compreende um folheto que indica que o anticorpo neutraliza a actividade da miostatina ou diminui o nível de miostatina presente no sistema.

O invento proporciona ainda um ácido nucleico isolado codificando um anticorpo do invento; um vector (ou vectores) compreendendo o ácido nucleico, opcionalmente operativamente ligado a sequências de controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector; uma célula hospedeira compreendendo esse vector; um processo para produção de um anticorpo do invento compreendendo a cultura da célula hospedeira de modo a que o ácido nucleico seja expresso e, opcionalmente, recuperação do anticorpo a partir o meio de cultura da célula hospedeira.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 mostra a sequência de aminoácidos da pró-miostatina humana com a sequência sinal sublinhada e a porção da proteína no terminal carboxilo que forma um monómero da forma madura de miostatina em letras a negrito.

A FIG. 2 mostra a sequência de aminoácidos da miostatina madura humana monomérica. A miostatina humana activa é um homodímero deste polipéptido associado por ligações dissulfureto. Esta sequência é idêntica à da miostatina madura de ratinho, rato, galinha, peru, cão, cavalo e porco.

A FIG. 3 mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos da miostatina madura de várias espécies de mamífero ou de ave.

A FIG. 4 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da forma madura da miostatina humana e de GDF-11 humano.

A FIG. 5 mostra a sequência de aminoácidos da HCVR e LCVR do anticorpo YN41, um anticorpo-mãe exemplar dos anticorpos do invento. A figura mostra ainda uma sequência nucleotídica exemplar codificando a HCVR e LCVR do anticorpo YN41.

A FIG. 6 mostra a sequência de aminoácidos das CDR da LCVR de vários anticorpos.

A FIG. 7 mostra a sequência de aminoácidos das CDR da HCVR de vários anticorpos.

A FIG. 8 mostra a sequência de aminoácidos da

região constante da cadeia leve capa que pode ser operativamente ligada à LCVR de um anticorpo do invento na geração de uma cadeia leve inteira de um anticorpo do invento e a sequência de aminoácidos de um domínio da região constante de IgG4 que pode ser operativamente ligada à HCVR de um anticorpo do invento na geração de uma cadeia pesada inteira de um anticorpo do invento. A figura mostra ainda uma sequência nucleotídica exemplar codificando a região constante da cadeia leve capa e uma sequência nucleotídica exemplar codificando um domínio da cadeia pesada de IgG4.

A FIG 9 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos das LCVR de vários anticorpos. Os domínios CDR estão sublinhados na primeira sequência de anticorpo.

A FIG. 10 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos das HCVR de vários anticorpos. Os domínios CDR estão sublinhados na primeira sequência de anticorpo.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O invento apresenta anticorpos monoclonais anti-miostatina quiméricos ou humanizados ou porções de ligação ao抗原 destes capazes de neutralizar ou antagonizar pelo menos uma actividade da miostatina *in vitro* e/ou *in vivo* caracterizados ainda como demonstrando um IC₅₀ igual a cerca de 1 nM e um ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* e demonstrando uma forte afinidade de ligação a

miostatina. Os anticorpos do invento são ainda caracterizados por se ligarem de preferência à miostatina em detrimento do homólogo de miostatina mais próximo, GDF-11 em pelo menos 20%.

Definições

Quando aqui utilizado, o termo "miostatina madura" (ver SEQ ID NO: 2 para as espécies humana, de murídeo, rato, galinha, peru, canina, equina e suína) refere-se à forma monomérica ou homodimérica da proteína resultante após clivagem proteolítica em Arg 266 da forma de pró-proteína de 375 aminoácido da miostatina. Quando aqui utilizado, o termo "miostatina" refere-se a miostatina madura. Quando aqui utilizado, o termo "pró-miostatina" ou "forma de pró-proteína da miostatina" quando utilizado com referência à proteína humana refere-se a uma proteína compreendendo a sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 como um monómero ou homodímero.

Um anticorpo inteiro tal como existe naturalmente é uma molécula de imunoglobulina constituída por quatro cadeias peptídicas, duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50-70 kDa quando inteiras) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa quando inteiras) interligadas através de ligações dissulfureto. A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110 ou mais aminoácidos principalmente responsável pelo reconhecimento do抗ígeno. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define

uma região constante principalmente responsável pela função efectora.

As cadeias leves são classificadas como capa ou lambda e caracterizadas por uma região constante particular, tal como é conhecido na técnica. As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou epsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente, e vários destes podem ainda ser divididos em subclasses (isotipos) e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular conhecida na técnica. As estruturas das subunidades e as configurações tridimensionais das diferentes classes de anticorpos são bem conhecidas na técnica. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável de cadeia pesada N-terminal (aqui "HCVR") e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é constituída por três domínios (CH1, CH2, e CH3) para IgG, IgD, e IgA; e 4 domínios (CH1, CH2, CH3, e CH4) para IgM e IgE. Cada cadeia leve é constituída por uma região variável de cadeia leve (aqui "LCVR") e uma região constante de cadeia leve, CL. As regiões HCVR e LCVR podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, designadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, designadas por regiões estruturais (FR). Cada HCVR e LCVR é constituída por três CDR e quatro FR, dispostas a partir do terminal amino para o terminal carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4. Aqui as 3 CDR da cadeia pesada são referidas como "CDRH1, CDRH2, e CDRH3" e as 3 CDR da cadeia leve são referidas como "CDRL1, CDRL2 e CDRL3". As CDR contêm a maioria dos resíduos que formam interacções específicas com o抗原. CDR3 é tipicamente a maior fonte de diversidade molecular dentro do local de ligação ao抗原. A atribuição de aminoácidos a cada domínio está de acordo com convenções bem conhecidas [e.g., Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ou o esquema de numeração de Chothia tal como descrito em Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273: 927-948, 1997, ver também o sítio da internet <http://www.rubic.rdg.ac.uk/andrew/bioinfor/abs>]. A capacidade funcional de um anticorpo para se ligar a um determinado抗原 é grandemente influenciada pelas seis CDR.

O termo "anticorpo", em referência a um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento (ou simplesmente, "anticorpo monoclonal do invento"), tal como aqui utilizado, refere-se a um anticorpo monoclonal. Um "anticorpo monoclonal" tal como aqui utilizado refere-se a um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano, a menos que de outro modo aqui indicado. De preferência, um anticorpo monoclonal do invento existe numa população homogénea ou substancialmente homogénea. Os anticorpos monoclonais do invento podem ser produzidos utilizando, e.g., técnicas de hibridoma bem conhecidas na especialidade, bem como tecnologias recombi-

nantes, tecnologias de apresentação em fagos, tecnologias de síntese ou combinações de tais tecnologias ou outras tecnologias prontamente conhecidas na técnica. "Anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de uma única cópia ou clone, incluindo, e.g., qualquer clone eucariótico, procariótico, ou de fago, e não ao método pelo qual é produzido. Um "anticorpo monoclonal" pode ser um anticorpo intacto (compreendendo uma região Fc completa ou inteira), um anticorpo substancialmente intacto, ou uma porção ou um fragmento de um anticorpo compreendendo uma porção de ligação ao antigénio, e.g., um fragmento Fab, fragmento Fab' ou fragmento $F(ab')_2$ de um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

As regiões variáveis de cada par cadeia leve/pesada formam os locais de ligação ao antigénio do anticorpo. Assim, um anticorpo IgG intacto possui dois locais de ligação. Excepto em anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois locais de ligação são o mesmo. Tal como aqui utilizado, a "porção de ligação ao antigénio" ou "região de ligação ao antigénio" ou "fragmento de ligação ao antigénio" refere-se aqui indiferentemente àquela porção de uma molécula de anticorpo, no interior da região variável, que contém os resíduos de aminoácidos que interagem com um antigénio e conferem ao anticorpo a sua especificidade e afinidade para o antigénio. Esta porção de anticorpo inclui os resíduos de aminoácidos estruturais necessários para manter a conformação correcta dos resíduos de ligação ao antigénio. De preferência, as CDR da região

de ligação ao antigénio dos anticorpos do invento serão de origem em murídeo ou substancialmente de origem em murídeo com certos resíduos de aminoácidos alterados para melhorar uma determinada actividade (ver, e.g., Figs. 6 e 7). De preferência, as regiões estruturais dos anticorpos do invento são de origem humana, ou substancialmente de origem humana (pelo menos 95%, 97% ou 99% de origem humana; ver, e.g., Figs. 9 e 10). Noutras formas de realização, a região de ligação ao antigénio, ou as CDR da região de ligação ao antigénio, podem ser derivadas de outras espécies não humanas incluindo, mas não limitadas a, coelho, rato ou hamster. Noutras formas de realização, a região de ligação ao antigénio pode ser inteiramente de origem humana, ou substancialmente de origem humana, com certos resíduos de aminoácidos alterados para melhorar uma determinada actividade, e.g., afinidade ou especificidade (ver, e.g., as posições dos aminoácidos das Figs. 6 e 7, que estão a negrito e sublinhadas).

Além disso, um "anticorpo monoclonal" tal como aqui utilizado pode ser um fragmento Fv de cadeia simples que pode ser produzido através da união do ADN codificando a LCVR e a HCVR com uma sequência ligadora. (Ver, Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenburg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315, 1994). Entende-se que, independentemente de se os fragmentos ou porções são especificados, o termo "anticorpo" tal como aqui utilizado inclui tais fragmentos ou porções, bem como formas de cadeia

simples. Desde que a proteína mantenha a capacidade de se ligar especificamente ou preferencialmente ao seu alvo pretendido (*i.e.*, epitopo ou antigénio), está incluída no termo "anticorpo".

Uma "população de anticorpos monoclonais", refere-se a uma população de anticorpos homogénea ou substancialmente homogénea (*i.e.*, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, de maior preferência pelo menos cerca de 97% ou 98% ou ainda de preferência pelo menos 99% dos anticorpos na população competiriam num ensaio ELISA pelo mesmo antigénio ou epitopo). Os anticorpos podem ou não ser glicosilados e ainda estar dentro dos limites do invento. Os anticorpos monoclonais podem ser homogéneos se tiverem uma sequência de aminoácidos idêntica, embora possam diferir numa modificação pós-tradução, *e.g.*, padrão de glicosilação.

Uma "variante" de anticorpo anti-miostatina, refere-se aqui a uma molécula que difere na sequência de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-miostatina "mãe" em virtude da adição, deleção e/ou substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência do anticorpo-mãe. Na forma de realização preferida, a variante compreende uma ou mais substituições de aminoácidos numa ou mais regiões CDR do anticorpo-mãe. Por exemplo, a variante pode compreender pelo menos uma (*e.g.*, de cerca de uma a cerca de dez, e de preferência de cerca de duas a cerca de cinco) substituição numa ou mais

regiões CDR do anticorpo-mãe. A identidade ou homologia em relação à sequência variante é aqui definida como a percentagem dos resíduos aminoácidos na sequência variante que são idênticos aos resíduos nos anticorpos parentais, após o alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima de identidade da sequência. Nenhuma das extensões, deleções ou inserções N-terminais, C-terminais ou internas, na sequência do anticorpo deve ser considerada como afectando a identidade ou homologia da sequência. A variante mantém a capacidade de se ligar a miostatina e tem de preferência propriedades que são superiores às do anticorpo-mãe. Por exemplo, a variante pode ter afinidade de ligação mais forte, IC_{50} inferior num ensaio de SBE/repórter ou maior capacidade para inibir uma bioactividade da miostatina. O anticorpo variante de particular interesse aqui é um que apresenta pelo menos cerca de 5 vezes, de preferência pelo menos cerca de 10 vezes, e de maior preferência pelo menos cerca de 20, 30, ou 50 vezes de aumento numa actividade biológica quando comparado com o anticorpo-mãe.

O anticorpo- "mãe" aqui é um que é codificado por uma sequência de aminoácidos utilizada para a preparação da variante. O anticorpo-mãe pode ter uma estrutura de murídeo, mas tem de preferência uma região estrutural humana. O anticorpo-mãe pode ser um anticorpo de murídeo (ver e.g., Figs x aqui), quimérico, humanizado ou humano.

O termo "liga-se especificamente" tal como aqui utilizado refere-se à situação em que um membro de um par de ligação específica não se liga significativamente a outras moléculas para além do ou dos seus parceiros de ligação específica tal como medido através de uma técnica disponível na especialidade, *e.g.*, ELISA de competição, ensaio BIACORE ou ensaio KINEXA. O termo é também aplicável quando, *e.g.*, um domínio de ligação ao抗igénio de um anticorpo do invento é específico para um determinado epitopo que é transportado por vários抗igénios, caso em que o anticorpo específico que transporta o domínio de ligação ao抗igénio será capaz de se ligar especificamente aos vários抗igénios transportando o epitopo. Assim, um anticorpo monoclonal do presente invento liga-se especificamente a GDF-8 e GDF-11.

O termo "liga-se preferencialmente" tal como aqui utilizado refere-se à situação em que um anticorpo se liga a um抗igénio específico, pelo menos cerca de 20% mais do que se liga a um抗igénio diferente, conforme medido através de uma técnica disponível na especialidade, *e.g.*, ELISA de competição ou medição de K_D com ensaio BIACORE ou KINEXA. Por conseguinte, um anticorpo monoclonal do presente invento liga-se preferencialmente a GDF-8 em detrimento de GDF-11. Semelhantemente, um anticorpo pode ligar-se de preferência a um epitopo dentro de um抗igénio em relação a um epitopo diferente no mesmo抗igénio.

O termo "epitopo" refere-se à porção de uma

molécula capaz de ser reconhecida e ligada por um anticorpo numa ou mais das regiões de ligação ao antigénio do anticorpo. Os epitopos consistem frequentemente num agrupamento de moléculas de superfície quimicamente activas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e têm características estruturais tridimensionais específicas bem como características de carga específicas. Por "epitopo de inibição" e/ou "epitopo de neutralização" designa-se um epitopo, que quando no contexto da molécula intacta (neste caso, miostatina) e quando ligado a um anticorpo específico para o epitopo, resulta em perda ou diminuição de uma actividade biológica da molécula ou organismo contendo a molécula, *in vivo* ou *in vitro*.

O termo "epitopo", tal como aqui utilizado, refere-se ainda a uma porção de um polipéptido possuindo actividade antigénica e/ou imunogénica num animal, de preferência um mamífero, *e.g.*, um rato ou um humano. O termo "epitopo antigénico", tal como aqui utilizado, é definido como uma porção de um polipéptido à qual um anticorpo se pode ligar especificamente, tal como determinado através de qualquer método bem conhecido na técnica, por exemplo, através de imunoensaios convencionais. Os epitopos antigénicos não necessitam de ser necessariamente imunogénicos, mas podem ser imunogénicos. Um "epitopo imunogénico", tal como aqui utilizado, é definido como uma porção de um polipéptido que desencadeia uma resposta de anticorpos num animal, tal como determinado através de qualquer método conhecido na técnica. (ver,

e.g., Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002 (1983)).

As frases "propriedade biológica" ou "bioatividade," "actividade" ou "actividade biológica", em referência a um anticorpo do presente invento, são aqui utilizadas indiferentemente e incluem, mas não estão limitadas a, afinidade e especificidade do epitopo/antígeno, capacidade de neutralizar ou antagonizar uma actividade de miostatina *in vivo* ou *in vitro*, IC₅₀ num ensaio repórter de miostatina/SBE ou outro ensaio de actividade *in vitro*, a estabilidade *in vivo* do anticorpo e as propriedades imunogénicas do anticorpo. Outras propriedades biológicas identificáveis de um anticorpo incluem, por exemplo, reactividade cruzada, (*i.e.*, com homólogos não humanos do péptido alvo ou com outras proteínas ou tecidos, em geral) e capacidade para preservar elevados níveis de expressão da proteína em células de mamífero. As propriedades ou características acima mencionadas podem ser observadas ou medidas ou avaliadas utilizando técnicas reconhecidas na especialidade, incluindo, mas não limitadas a, ELISA, ELISA competitivo, análise de ressonância de plasmão de superfície, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* sem limites, ligação ao receptor, produção e/ou secreção de citocinas ou factores de crescimento, desenvolvimento do polo animal de *Xenopus*, transdução de sinal e imuno-histoquímica com cortes de tecidos de diferentes fontes incluindo humana, de primata, ou qualquer outra fonte conforme possa ser a necessidade.

O termo "actividade da miostatina" tal como aqui utilizado refere-se a uma ou mais das actividades fisiologicamente reguladoras do crescimento ou morfogenéticas associadas à proteína miostatina activa. Por exemplo, a miostatina activa é um regulador negativo da massa muscular esquelética. A miostatina activa pode também modular a produção de enzimas específicas do músculo (e.g., creatinacinase), estimular a proliferação de mioblastos, e modular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos.

O termo "inibir" ou "neutralizar" tal como aqui usado em relação a uma actividade de um anticorpo do invento, significa a capacidade de antagonizar substancialmente, proibir, prevenir, restringir, atrasar, interromper, eliminar, parar, reduzir ou reverter, e.g., a progressão ou gravidade do que está a ser inibido incluindo, mas não limitado a, uma actividade ou propriedade biológica, uma doença ou uma condição. A inibição ou neutralização é de preferência pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais.

O termo "isolado" quando utilizado em relação a um ácido nucleico ou uma proteína (e.g., um anticorpo) refere-se a uma sequência de ácido nucleico ou proteína que é identificada e separada de pelo menos um contaminante com o qual está vulgarmente associada na sua fonte natural. De preferência, um "anticorpo isolado" é um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos possuindo

especificidades antigénicas diferentes (e.g., composições farmacêuticas do invento compreendem um anticorpo isolado que se liga especificamente a miostatina e é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antigénios para além da miostatina).

Os termos "numeração de Kabat" e "marcação de Kabat" são aqui utilizados indiferentemente. Estes termos, que são reconhecidos na técnica, referem-se a um sistema de numeração de resíduos de aminoácidos que são mais variáveis (i.e., hipervariáveis) além de outros resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo (Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-93 (1971); Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Um polinucleótido está "operativamente ligado" quando é colocado numa relação funcional com outro polinucleótido. Por exemplo, um promotor ou estimulador está operativamente ligado a uma sequência de codificação se afectar a transcrição da sequência. Um péptido está "operativamente ligado" a outro péptido quando os polinucleótidos que os codificam estão operativamente ligados, de preferência estão no mesmo enquadramento de leitura aberto.

Os termos "indivíduo", "sujeito" e "paciente", aqui utilizados indiferentemente, referem-se a um animal,

de preferência uma espécie de mamífero (incluindo um não primata e um primata) ou de ave, incluindo, mas não limitado a, murídeos, símios, humanos, animais mamíferos de quinta (e.g., bovinos, suíños, ovinos), animais mamíferos de desporto (e.g., equinos), e animais mamíferos de estimação (e.g., caninos e felinos); de preferência, o termo refere-se a humanos. O termo refere-se também a espécies de aves, incluindo, mas não limitadas a, galinhas e perus. Numa certa forma de realização, o sujeito, de preferência um mamífero, de preferência um humano, caracteriza-se ainda com uma doença ou um distúrbio ou uma condição que beneficiaria de um menor nível ou menor bioactividade de miostatina. Noutra forma de realização, o sujeito, de preferência um mamífero, de preferência um humano, caracteriza-se ainda como estando em risco de desenvolver um distúrbio, uma doença ou condição que beneficiaria de um menor nível de miostatina ou uma menor bioactividade de miostatina.

O termo "vector" inclui uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligado incluindo, mas não limitado a, plasmídeos e vectores virais. Certos vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos enquanto outros vectores podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira, e são assim replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão operaci-

onalmente ligados. Tais vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinante" (ou simplesmente "vectores de expressão") e exemplos de vectores são bem conhecidos na técnica.

Tal como aqui utilizado, as expressões "célula", "célula hospedeira", "linha celular", e "cultura celular" são utilizados indiferentemente e incluem uma célula individual ou cultura celular que é um receptor de qualquer polinucleótilo isolado do invento ou qualquer ou quaisquer vectores recombinantes compreendendo uma sequência codificando uma HCVR, LCVR ou um anticorpo monoclonal do invento. As células hospedeiras incluem descendência de uma única célula hospedeira, e a descendência pode não ser necessariamente completamente idêntica (na morfologia ou no complemento do ADN total) à célula-mãe original devido a mutação e/ou alteração natural, acidental, ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transformadas, transduzidas ou infectadas *in vivo* ou *in vitro* com um ou mais vectores recombinantes ou um polinucleótilo expressando um anticorpo monoclonal do invento ou uma cadeia leve ou cadeia pesada deste. Uma célula hospedeira que compreende um vector recombinante do invento (quer estavelmente incorporado no cromossoma hospedeiro ou não) pode também ser referida como uma "célula hospedeira recombinante". Células hospedeiras preferidas para utilização no invento são células CHO (e.g., ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0 e células COS (ATCC e.g., CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Células hospedeiras

adicionais para utilização no invento incluem células vegetais, células de levedura, outras células de mamífero e células procarióticas.

Caracterização do Anticorpo

O presente invento refere-se a anticorpos monoclonais isolados que se ligam especificamente a miostatina com elevada afinidade. Os anticorpos do invento são anticorpos quiméricos ou humanizados ou porções de ligação ao抗原 destes. Além disso, os anticorpos do invento neutralizam ou antagonizam uma actividade biológica da miostatina *in vivo* ou *in vitro*. A ligação específica de anticorpos monoclonais anti-miostatina do invento à miostatina permite que os anticorpos do invento sejam utilizados como terapêuticos ou profilácticos para condições, doenças ou distúrbios, associados a miostatina, *i.e.*, condições, doenças ou distúrbios que beneficiem da redução dos níveis de miostatina ou da antagonização ou inibição de uma actividade biológica da miostatina.

Numa forma de realização preferida, o invento proporciona um anticorpo monoclonal anti-miostatina que se liga a miostatina ou a uma porção deste com uma afinidade de ligação (K_D) para miostatina de menos do que cerca de $1,4 \times 10^{-12}$ M. Alternativamente, os anticorpos do invento caracterizam-se por uma K_D para miostatina de não mais do que cerca de $1,4 \times 10^{-12}$ M. As afinidades dos anticorpos podem ser determinadas tal como aqui descritas nos exemplos abaixo.

De preferência, tais anticorpos do invento caracterizados por uma forte afinidade de ligação tal como aqui descrito, têm também uma IC₅₀ de 1 nM num ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro*. Os anticorpos caracterizados por uma forte afinidade de ligação tal como aqui descrito, têm um IC₅₀ num ensaio repórter de miostatina/SBE *in vitro* pelo menos 20% menor, de maior preferência pelo menos cerca de duas vezes, três vezes ou quatro vezes menor que o IC₅₀ do anticorpo num ensaio repórter de GDF-11/SBE *in vitro* (tal como aqui descrito no Exemplo 5). De preferência, tais anticorpos do invento caracterizados por uma forte afinidade de ligação tal como aqui descrito, são ainda caracterizados por reagirem preferencialmente com GDF-8 em detrimento de GDF-11 em pelo menos 20%, conforme medido por uma técnica na especificidade, *e.g.*, através de ELISA de competição, ou através de ensaio BIACORE ou KINEXA para demonstrar uma afinidade pelo menos 20% mais elevada (*i.e.*, menor K_D) do anticorpo para GDF-8 que para GDF-11.

De preferência, os polipeptídos de miostatina e GDF-11 testados quanto à ligação preferencial de um anticorpo do invento são ambos formas homodiméricas da proteína madura, de preferência de origem em mamífero ou ave, de maior preferência de origem humana. No entanto, a miostatina e os polipeptídos GDF-11 testados quanto à ligação preferencial de um anticorpo do invento podem ser a forma monomérica da proteína madura ou a forma de pró-proteína.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando o método de hibridoma amplamente conhecido na técnica (ver, e.g., Kohler et al., *Nature*, 256: 495, 1975) ou podem ser produzidos por métodos de ADN recombinante (e.g., tal como na Patente U.S. No. 4816567). Geralmente, um hibridoma pode ser produzido pela fusão de uma linha celular imortal adequada (e.g., uma linha celular de mieloma, tal como SP2/0) com células produtoras de anticorpos do animal imunizado. As células produtoras de anticorpos, de preferência as do baço ou dos nódulos linfáticos, são obtidas a partir de animais imunizados com o抗原 de interesse. As células fundidas (hibridomas) podem ser isoladas utilizando condições de cultura selectivas e clonadas por diluição limitante. O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o抗原. De preferência, a especificidade de ligação dos mAb produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ELISA. As células que produzem anticorpos com as propriedades de ligação desejadas podem ser seleccionadas através de um ensaio de rastreio adequado. Os métodos para tal isolamento e rastreio são bem conhecidos na técnica.

Outros métodos adequados para produzir ou isolar anticorpos do invento podem ser utilizados, incluindo, por exemplo, métodos que seleccionam um anticorpo recombinante

(e.g., Fv ou Fab de cadeia simples) a partir de uma biblioteca, ou que se baseiam na imunização de animais transgénicos (e.g., ratinhos) capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos (ver, e.g., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555, 1993; Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258, 1993; Lonberg *et al.*, Patente U.S. Número 5545806; Surani *et al.*, Patente U.S. Número 5545807).

Os anticorpos de cadeia simples e os anticorpos quiméricos ou humanizados (com CDR enxertadas), bem como os anticorpos quiméricos ou de cadeia simples com CDR enxertadas, e semelhantes, compreendendo porções derivadas de diferentes espécies, estão também englobados pelo presente invento e o termo "anticorpo". As várias porções destes anticorpos podem ser unidas quimicamente por técnicas convencionais, por via sintética, ou podem ser preparadas como uma proteína contígua utilizando técnicas de engenharia genética. Por exemplo, podem ser expressos ácidos nucleicos codificando uma cadeia quimérica ou humanizada para produzir uma proteína contígua. Ver, e.g., Patente U.S. No. 4816567; Patente Europeia No. 0125023 B1; Patente U.S. No. 4816397; Patente Europeia No. 0120694 B1; WO 86/01533; Patente Europeia No. 0194276 B1; Patente U.S. No. 5225539; Patente Europeia No. 0239400 B1 e Patente U.S. Nos. 5585089 e 5698762. Ver também, Ladner *et al.*, Patente U.S. No. 4946778 e Bird, R.E. *et al.*, *Science*, 242: 423-426, 1988, em relação a anticorpos de cadeia simples.

Além disso, porções funcionais dos anticorpos, incluindo porções de ligação ao antigénio de anticorpos químéricos, humanizados ou de cadeia simples, podem também ser produzidas. As porções funcionais dos anticorpos anteriores retêm pelo menos uma função de ligação ao antigénio e/ou função biológica ou bioactividade do anticorpo inteiro a partir do qual são derivadas. As porções funcionais preferidas mantêm uma função de ligação ao antigénio de um anticorpo inteiro correspondente (e.g., a capacidade de se ligar a uma forma madura de miostatina de mamífero). As porções ou os fragmentos funcionais particularmente preferidos retêm a capacidade de inibir uma ou mais funções ou bioactividades características de uma miostatina madura de mamífero, tal como uma actividade de ligação, uma actividade de sinalização, e/ou estimulação de uma resposta celular. Por exemplo, numa forma de realização, uma porção ou um fragmento funcional pode inibir a interacção da miostatina madura com um ou mais dos seus ligandos e/ou pode inibir uma ou mais funções mediadas pelo receptor.

Porções ou fragmentos de anticorpos capazes de se ligar à miostatina madura incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fv, Fab, Fab' e F(ab')₂ e estão englobados pelo invento. Tais fragmentos podem ser produzidos através de clivagem enzimática ou através de técnicas recombinantes. Por exemplo, a clivagem com papaína ou pepsina pode gerar fragmentos Fab ou F(ab')₂, respectivamente. O menor fragmento de ligação ao antigénio é Fv, que consiste nos

domínios HCVR e LCVR. O fragmento Fab consiste nos domínios HCVR-CH1 e LCVR-CL ligados covalentemente por uma ligação dissulfureto entre as regiões constantes. Para superar a tendência dos domínios HCVR e LCVR não ligados covalentemente no Fv para se dissociarem quando co-expresos numa célula hospedeira, um chamado fragmento Fv de cadeia simples (sc) (scFv) pode ser construído, em que um polipeptídeo flexível e adequadamente longo liga o terminal C da HCVR ao terminal N da LCVR ou o terminal C da LCVR ao terminal N da HCVR. O ligador mais vulgarmente usado foi um péptido de 15 resíduos (Gly₄Ser)₃, mas outros ligadores são também conhecidos na técnica. Os anticorpos também podem ser produzidos numa variedade de formas truncadas utilizando genes de anticorpos em que um ou mais codões de terminação foram introduzidos a montante do local de terminação natural. Por exemplo, pode ser concebido um gene quimérico codificando uma porção de cadeia pesada F(ab')₂ para incluir sequências de ADN codificando o domínio CH₁ e a região charneira da cadeia pesada.

A selecção de fragmentos de anticorpo a partir de bibliotecas utilizando tecnologias de enriquecimento tais como apresentação em fagos (Matthews, DJ e Wells, JA. *Science*, 260: 1113-7, 1993), apresentação em ribossomos (Hanes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95: 14130-5, 1998), apresentação bacteriana (Samuelson, P., et al., *Journal of Biotechnology*, 96: 129-54, 2002) ou apresentação em leveduras (Kieke, MC, et al., *Protein Engineering*, 10: 1303-10, 1997), provou serem alternativas de sucesso à

tecnologia de hibridomas clássica (revisões recentes: Little, M. et al., *Immunology Today*, 21: 364-70, 2000).

Anticorpos Variantes

Um anticorpo monoclonal de murídeo ou um anticorpo humano (produzido *e.g.*, num ratinho transgénico) criado contra a miostatina ou contra uma proteína compreendendo um epitopo imunogénico do invento é um anticorpo-mãe. Um anticorpo-mãe de murídeo pode ainda ser alterado para criar uma forma quimérica ou humanizada do anticorpo, utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Tais anticorpos quiméricos ou humanizados, podem servir como anticorpos originais para mais variação ou mutagénese. Os anticorpos-mãe do invento podem ainda ser mutagenizados *e.g.*, dentro do ou dos domínios das CDR (ver, *e.g.*, Figs. 6 e 7) para criar um anticorpo variante com uma propriedade optimizada de interesse, *e.g.*, afinidade de ligação, IC_{50} , especificidade, etc. Um anticorpo variante de substituição de aminoácidos é preferido e tem pelo menos um resíduo de aminoácido da molécula de anticorpo-mãe removido e um resíduo diferente inserido no seu lugar. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões CDR, mas alterações em FR também estão contempladas. São preferidas substituições de aminoácidos conservativas. Se tais substituições resultarem numa alteração numa actividade biológica do anticorpo, então podem ser introduzidas alterações mais substanciais, isto é, alterações de aminoácidos não conservativas, e os produtos pesquisados.

Um modo conveniente para gerar variantes de substituição é a maturação de afinidade utilizando apresentação em fagos. Resumidamente, vários locais de regiões CDR são mutados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácidos em cada local. As variantes de anticorpo assim geradas são apresentadas de um modo monovalente a partir de partículas fágicas filamentosas como fusões com o produto do gene III de M13 empacotadas em cada partícula. As variantes apresentadas em fagos são então rastreadas quanto à sua actividade biológica (e.g., afinidade de ligação, especificidade, IC_{50}), tal como aqui divulgado. Para identificar locais da região CDR candidatos para modificação, pode ser efectuada mutagénese de varrimento de alaninas para identificar resíduos da região CDR contribuindo significativamente para a ligação ao抗ígenio. Alternativamente, ou em adição, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo抗ígeno-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e a miostatina. Tais resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas ou conhecidas na especialidade. Alternativamente, ou em adição, pode ser realizada mutagénese aleatória numa ou mais sequências de CDR numa ou mais posições de resíduos, quer quando a CDR está operativamente ligada à região variável quer quando a CDR é independente de outra sequência da região variável e, em seguida, a CDR alterada é devolvida à região variável utilizando tecnologia de ADN recombinante. Uma vez gerados

tais anticorpos variantes, o painel de variantes é submetido a rastreio tal como aqui descrito e anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionados para posterior desenvolvimento.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação correcta de um anticorpo anti-miostatina do invento pode ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e impedir reticulação aberrante. Por outro lado, pode ser adicionada uma ou mais ligações de cisteína ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Outro tipo de variante de aminoácidos do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alteração entende-se eliminar uma ou mais porções hidrato de carbono verificadas no anticorpo, e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no anticorpo-mãe.

A glicosilação dos anticorpos é tipicamente ligada em N ou ligada em O. Ligada em N refere-se à ligação da porção hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. A sequência do tripéptido asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da porção hidrato de carbono à

cadeia lateral das asparaginas. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências de tripéptido num polipéptido cria um potencial local de glicosilação. A glicosilação ligada em O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais vulgarmente serina ou treonina, embora possa também ser utilizada 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida alterando a sequência de aminoácidos de modo a que contenha uma ou mais das sequências de tripéptido acima descritas (para locais de glicosilação ligados em N). A alteração pode também ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligados em O).

Sequência

Além disso, um anticorpo monoclonal do invento é um anticorpo monoclonal compreendendo dois polipéptidos com as sequências SEQ ID NOS: 98 e 138.

Num anticorpo humanizado para utilização terapêutica em humanos, a sequência estrutural é de preferência inteiramente ou substancialmente de origem humana (*i.e.*, pelo menos, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de origem humana). Por exemplo, o anticorpo 3-74/C1E4 compreende uma

região variável de cadeia leve compreendendo FR1 com SEQ ID NO: 143, CDR1 com SEQ ID NO: 9, FR2 com SEQ ID NO: 144, CDR2 com SEQ ID NO: 18, FR3 com SEQ ID NO: 145, CDR3 com SEQ ID NO: 25 e FR4 com SEQ ID NO: 146. O anticorpo 3-74/C1E4 compreende ainda uma região variável de cadeia pesada compreendendo FR1 com SEQ ID NO: 149, CDR1 com SEQ ID NO: 40, FR2 com SEQ ID NO: 151, CDR2 com SEQ ID NO: 60, FR3 com SEQ ID NO: 153, CDR3 com SEQ ID NO: 72 e FR4 com SEQ ID NO: 139. Num anticorpo para utilização num animal não humano, a sequência da região estrutural pode ser substancialmente originária do genoma humano (de preferência utilizado num animal não humano quando é um embrião ou recém-nascido) ou do genoma do animal em que é para ser utilizado terapeuticamente.

Expressão do Anticorpo

O presente invento é também dirigido a linhas celulares que expressam um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento ou uma porção deste. A criação e o isolamento de linhas celulares produtoras de um anticorpo monoclonal do invento podem ser realizados utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade. As linhas celulares preferidas incluem COS, CHO, SP2/0, NS0 e de levedura (disponíveis a partir de repositórios públicos tais como a ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Uma grande variedade de sistemas de expressão

hospedeiros pode ser utilizada para expressar um anticorpo do presente invento incluindo sistemas de expressão procarióticos (bacterianos) e eucarióticos (tais como células de levedura, baculovírus, vegetais, de mamífero e de outros animais, animais transgénicos, e células de hibridoma), bem como sistemas de expressão de apresentação em fagos. Um exemplo de um vector de expressão bacteriano adequado é pUC119 e um vector de expressão eucariótico adequado é um vector pcDNA3.1 modificado com um sistema de selecção de DHFR enfraquecido. Outros sistemas de expressão de anticorpos são também conhecidos na técnica e estão aqui contemplados.

Um anticorpo do invento pode ser preparado através de expressão recombinante dos genes da cadeia leve e pesada de imunoglobulina numa célula hospedeira. Para expressar um anticorpo de forma recombinante, uma célula hospedeira é transformada, transduzida, infectada ou similar, com um ou mais vectores de expressão recombinantes possuindo fragmentos de ADN codificando cadeias leves e/ou pesadas de imunoglobulina do anticorpo de modo a que as cadeias leves e/ou pesadas sejam expressas na célula hospedeira. A cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de diferentes promotores aos quais estão operativamente ligadas num vector ou, alternativamente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de promotores diferentes aos quais estão operativamente ligados em dois vectores - um expressando a cadeia pesada e um expressando

a cadeia leve. Opcionalmente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas em diferentes células hospedeiras. De preferência, os anticorpos recombinantes são segregados para o meio em que as células hospedeiras são cultivadas, a partir do qual os anticorpos podem ser recuperados ou purificados. Metodologias de ADN recombinante padrão são usadas para obter genes de cadeia pesada e leve do anticorpo, incorporar estes genes em vectores de expressão recombinantes e introduzir os vectores em células hospedeiras. Tais tecnologias de ADN recombinante padrão são descritas, por exemplo, em Sambrook, Fritsch, e Maniatis (Eds.), "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", Segunda Edição, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, et al. (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

Um ADN isolado codificando uma região HCVR pode ser convertido num gene de cadeia pesada inteiro ligando de forma operativa o ADN codificando HCVR a outra molécula de ADN codificando regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2, e CH3). As sequências dos genes da região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica. Ver, e.g., Kabat, et al., Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242 (1991). Os fragmentos de ADN englobando estas regiões podem ser obtidos, e.g., através de amplificação por PCR padrão. A região constante da cadeia pesada pode ser de qualquer tipo (e.g., IgG, IgA, IgE, IgM ou IgD), classe (e.g., IgG₁,

IgG₂, IgG₃ e IgG₄) ou subclasse de região constante e qualquer variante alotípica destas tal como descrito em Kabat (*supra*). Alternativamente, a porção de ligação ao抗ígeno pode ser um fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento Fd ou um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Para um gene de cadeia pesada do fragmento Fab, o ADN codificando HCVR pode ser operativamente ligado a outra molécula de ADN codificando apenas uma região constante CH1 de cadeia pesada.

Um ADN isolado codificando uma região LCVR pode ser convertido num gene de cadeia leve inteira (bem como num gene de cadeia leve de Fab) através da ligação operativa do ADN codificando LCVR a outra molécula de ADN codificando uma região constante de cadeia leve, CL. As sequências dos genes de região constante de cadeia leve humana são conhecidas na técnica. Ver, *e.g.*, Kabat, *supra*. Fragmentos de ADN englobando estas regiões podem ser obtidos através de amplificação por PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de ADN codificando HCVR e LCVR são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligador flexível, *e.g.*, codificando a sequência de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo a que as sequências de HCVR e LCVR possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões de LCVR e HCVR unidas através do ligador flexível.

Ver, e.g., Bird, et al., *Science* 242: 423-6, 1988; Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83, 1988; McCafferty, et al., *Nature* 348: 552-4, 1990.

Para expressar um anticorpo do invento, um ADN codificando uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada parcial ou inteira, obtido tal como descrito acima, é inserido num vector de expressão de modo a que o gene seja operativamente ligado a sequências de controlo da transcrição e tradução. O vector de expressão e as sequências de controlo da expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene da cadeia leve de anticorpo e o gene da cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vectores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vector de expressão por métodos convencionais. Além disso, o vector de expressão recombinante pode codificar um péptido sinal que facilita a secreção da cadeia leve e/ou pesada do anticorpo monoclonal anti-miostatina a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia leve e/ou pesada do anticorpo monoclonal anti-miostatina pode ser clonado no vector de modo a que o péptido sinal seja operativamente ligado enquadrado com o terminal amino do gene da cadeia de anticorpo. O péptido sinal pode ser um péptido sinal de imunoglobulina ou um péptido sinal heterólogo.

Além do ou dos genes da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo, um vector de expressão recombinante do

invento possui sequências reguladoras que controlam a expressão do ou dos genes das cadeias do anticorpo numa célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" pretende incluir promotores, estimuladores e outros elementos de controlo da expressão (e.g., sinais de poliadenilação), conforme necessário, que controlam a transcrição ou tradução do ou dos genes das cadeias do anticorpo. O desenho do vector de expressão, incluindo a selecção das sequências reguladoras pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a transformar, o nível de expressão da proteína desejada. As sequências reguladoras preferidas para a expressão de células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que dirigem elevados níveis de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e/ou estimuladores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus, (e.g., o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e vírus de poliomia.

Além dos genes da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo e das sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinantes do invento podem possuir sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (e.g., origens de replicação) e um ou mais genes marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a selecção das células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido. Por exemplo, tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou

metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes marcadores seleccionáveis preferidos incluem um gene da di-hidrofolato-redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras negativas para DHFR com selecção/amplificação com metotrexato), o gene neo (para selecção com G418), e glutamina-sintetase (GS) numa linha celular negativa para GS (tal como NS0) para selecção/amplificação.

Para a expressão da cadeias leves e/ou pesadas, o ou os vectores de expressão codificando as cadeias pesadas e/ou leves são introduzidos numa célula hospedeira através de técnicas padrão e.g., electroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com DEAE-dextrano, transdução, infecção e semelhantes. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos do invento em células hospedeiras quer procarióticas quer eucarióticas, são preferidas as células eucarióticas, e de maior preferência células hospedeiras de mamífero, porque é mais provável que tais células montem e segreguem um antícorpo correctamente enrolado e imunologicamente activo. Células hospedeiras de mamífero preferidas para expressão dos anticorpos recombinantes do invento incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células DHFR-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-20, 1980, utilizadas como um marcador seleccionável DHFR, e.g., tal como descrito em Kaufman e Sharp, *J. Mol. Biol.* 159: 601-21, 1982), células de mieloma NS0, células COS, e células SP2/0. Quando os vectores de

expressão recombinante codificando genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos através da cultura das células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, de maior preferência, a secreção do anticorpo para o meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir da célula hospedeira e/ou do meio de cultura utilizando métodos de purificação padrão.

As células hospedeiras podem também ser utilizadas para produzir porções ou fragmentos de anticorpos intactos, e.g., fragmentos Fab ou moléculas scFv, através de técnicas que são convencionais. Um perito entenderá que variações no procedimento acima estão dentro do âmbito do presente invento. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com ADN codificando quer a cadeia leve quer a cadeia pesada de um anticorpo deste invento. A tecnologia de ADN recombinante pode também ser usada para remover parte ou a totalidade do ADN codificando qualquer uma ou ambas as cadeias, leve e pesada, que não é necessário para a ligação a miostatina. As moléculas expressas a partir destas moléculas de ADN truncadas estão também englobadas pelos anticorpos do invento.

Num sistema preferido para expressão recombinante de um anticorpo do invento, um vector de expressão

recombinante codificando tanto a cadeia pesada do anticorpo como a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células DHFR-CHO através de, e.g., transfecção mediada por fosfato de cálcio. No vector de expressão recombinante, os genes da cadeia pesada e leve são, cada um, operacionalmente ligados a elementos reguladores estimulador/promotor (e.g., derivados de SV40, CMV, adenovírus e semelhantes, tais como um elemento regulador estimulador de CMV/promotor de AdMLP ou um elemento regulador estimulador de SV40/promotor de AdMLP) para dirigir elevados níveis de transcrição dos genes. O vector de expressão recombinante transporta também um gene DHFR, que permite a selecção de células CHO que foram transfectadas com o vector usando selecção/amplificação com metotrexato. As células hospedeiras transformantes seleccionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesadas e leves do anticorpo e o anticorpo intacto é recuperado a partir do meio de cultura. Técnicas de biologia molecular padrão são utilizadas para preparar o vector de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, seleccionar para transformantes, cultivar as células hospedeiras e recuperar o anticorpo a partir do meio de cultura. Os anticorpos, ou porções de ligação ao抗原 deste, do invento podem ser expressos num animal (e.g., um ratinho) que é transgénico para genes de imunoglobulina humana (ver, e.g., Taylor, et al., *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-95, 1992).

Uma vez expressos, os anticorpos intactos, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras

formas de imunoglobulina do presente invento podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo precipitação com sulfato de amónio, permuta iônica, cromatografia em coluna de afinidade, de fase reversa, de interacção hidrófoba, electroforese em gel e semelhantes. Imunoglobulinas substancialmente puras com pelo menos cerca de 90%, 92%, 94% ou 96% de homogeneidade são preferidas, e as de 98 a 99% ou mais de homogeneidade as mais preferidas, para utilizações farmacêuticas. Uma vez purificados, parcialmente ou até à homogeneidade, conforme desejado, os péptidos podem então ser utilizados terapeuticamente ou profilacticamente, tal como aqui dirigido.

Anticorpo quimérico

Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo quimérico" inclui imunoglobulinas monovalentes, bivalentes ou polivalentes. Um anticorpo quimérico monovalente é um dímero formado por uma cadeia pesada quimérica associada através de pontes dissulfureto com uma cadeia leve quimérica. Um anticorpo quimérico bivalente é um tetrâmero formado por dois dímeros de cadeia pesada-cadeia leve associados através de pelo menos uma ponte dissulfureto.

Uma cadeia pesada quimérica de um anticorpo comprehende uma região de ligação ao antigénio derivada da cadeia pesada de um anticorpo não humano específico para miostatina, que está operativamente ligado a pelo menos uma

porção de uma região constante de cadeia pesada tal como CH1 ou CH2, ou de preferência a uma região constante de cadeia pesada inteira humana, ou substancialmente humana (ou de uma espécie diferente da qual a região de ligação ao抗ígeno foi derivada). Uma cadeia leve quimérica de um anticorpo para utilização em humanos compreende uma região de ligação ao抗ígeno derivada inteiramente ou substancialmente da cadeia leve de um anticorpo não humano específico para miostatina, operativamente ligado a pelo menos uma porção de uma região constante de cadeia leve (CL), ou de preferência a uma região constante de cadeia leve inteira humana, ou substancialmente humana (ou de uma espécie diferente daquela da qual a região de ligação ao抗ígeno foi derivada). Anticorpos, fragmentos ou derivados possuindo cadeias pesadas e cadeias leves quiméricas da mesma ou diferente especificidade de ligação a região variável, podem também ser preparados através da associação apropriada das cadeias polipeptídicas individuais, de acordo com passos de métodos conhecidos.

Com esta abordagem, os hospedeiros expressando cadeias pesadas quiméricas são cultivados separadamente a partir de hospedeiros expressando cadeias leves quiméricas, e as cadeias de imunoglobulina são recuperadas separadamente e depois associadas. Alternativamente, os hospedeiros podem ser co-cultivados e as cadeias deixadas a associar-se espontaneamente no meio de cultura, seguido por recuperação da imunoglobulina ou do fragmento montados. Métodos para produzir anticorpos quiméricos são conhecidos

na técnica (ver, e.g., Patente U.S. Nos.: 6284471; 5807715; 4816567; e 4816397).

Anticorpos Humanizados

De preferência, um anticorpo do invento a utilizar para fins terapêuticos teria a sequência da estrutura e da região constante (na extensão em que existe no anticorpo) derivada do mamífero em que seria usado como um agente terapêutico de modo a diminuir a possibilidade de que o mamífero desencadeasse uma resposta imunitária contra o anticorpo terapêutico. Os anticorpos humanizados são de particular interesse, uma vez que são considerados valiosos para aplicação terapêutica e evitam a resposta de anticorpos humanos anti-ratinho frequentemente observada com anticorpos de roedor. Além disso, em anticorpos humanizados a porção efectora é humana, de modo que pode interagir melhor com outras partes do sistema imunitário humano (e.g., destruir as células alvo mais eficientemente através da citotoxicidade dependente do complemento ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos). Também, os anticorpos humanizados injectados podem ter uma semivida mais parecida com a dos anticorpos humanos de ocorrência natural do que , e.g., anticorpos de murídeo, permitindo deste modo que sejam dadas doses menores e menos frequentes. O termo "anticorpo humanizado" tal como aqui utilizado refere-se a um anticorpo compreendendo porções de anticorpos de diferente origem, em que pelo menos uma porção é de origem humana. Por exemplo, o anticorpo huma-

nizado pode compreender porções derivadas de um anticorpo de origem não humana com a especificidade necessária, tal como de ratinho, e de um anticorpo de origem humana, unidos quimicamente através de técnicas convencionais (e.g., sintéticas) ou preparados como um polipéptido contíguo usando técnicas de engenharia genética.

De preferência, um "anticorpo humanizado" possui CDR que são originárias de um anticorpo não humano (de preferência um anticorpo monoclonal de ratinho) enquanto a estrutura e a região constante, na extensão em está presente, (ou numa porção significativa ou substancial desta, i.e., pelo menos cerca de 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) são codificadas pela informação da sequência de ácido nucleico que ocorre na região da imunoglobulina da linha germinativa humana (ver, e.g., a International ImMunoGeneTics Database) ou em formas recombinadas ou mutadas desta quer os referidos anticorpos sejam ou não produzidos numa célula humana. As CDR de um anticorpo humanizado podem ser optimizadas a partir de uma CDR de um anticorpo-mãe não humano do qual são originárias para gerar as propriedades desejadas, e.g., especificidade, afinidade e capacidade. As CDR optimizadas podem ter substituições, adições e/ou deleções de aminoácidos, quando comparadas com as CDR parentais. Por exemplo, as posições dos aminoácidos das CDR que estão sublinhadas e em negrito nas Figs. 6 e 7 são as posições que foram optimizadas a partir das CDR parentais, tal como mostrado na Fig. 5.

Formas humanizadas de anticorpos não humanos (e.g., de murídeo) incluem um anticorpo intacto, um anticorpo substancialmente intacto, uma porção de um anticorpo compreendendo um local de ligação ao antigénio, ou uma porção de um anticorpo compreendendo um fragmento Fab, fragmento Fab', F(ab')₂, ou um fragmento Fv de cadeia simples. Os anticorpos humanizados contêm de preferência uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou estruturais importadas. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os aminoácidos nas regiões CDR correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os aminoácidos nas regiões FR são os de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreende também optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Os anticorpos humanizados podem ser submetidos a mutagénese *in vitro* usando métodos de rotina utilizados na técnica (ou, quando é usado um animal transgénico para sequências de Ig humanas, mutagénese somática *in vivo*) e, assim, as sequências de aminoácidos da região estrutural

das regiões HCVR e LCVR dos anticorpos recombinantes humanizados são sequências que, embora derivadas daquelas relacionadas com sequências da linha germinativa de HCVR e LCVR humanas, podem não existir naturalmente dentro do repertório de anticorpos humanos da linha germinativa *in vivo*. Está contemplado que tais sequências de aminoácidos das regiões estruturais HCVR e LCVR dos anticorpos recombinantes humanizados são pelo menos 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% ou, de maior preferência, ainda pelo menos 99% idênticas a uma sequência da linha germinativa humana. De preferência, os resíduos estruturais do anticorpo-mãe (e.g., o anticorpo de murídeo ou geralmente o anticorpo a partir do qual o anticorpo humanizado é derivado) que mantêm ou afectam estruturas do local de combinação, serão retidos. Estes resíduos podem ser identificados e.g., através de cristalografia de raios-X do anticorpo-mãe ou fragmento Fab, identificando desse modo a estrutura tridimensional do local de ligação ao antigénio.

O anticorpo humanizado do presente invento pode compreender ou ser derivado de uma estrutura de cadeia leve da linha germinativa humana. Em formas de realização particulares, a sequência da cadeia leve da linha germinativa é seleccionada a partir de sequências VK humanas incluindo, mas não limitado 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, e O8. Em certas formas de realização,

esta estrutura de cadeia leve da linha germinativa humana é seleccionada a partir de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, e V5-6. Ver PCT WO 2005/005604 para uma descrição das diferentes sequências da linha germinativa.

Noutras formas de realização, o anticorpo humanizado do presente invento pode compreender ou ser derivado de uma estrutura de cadeia pesada da linha germinativa humana. Em formas de realização particulares, esta estrutura de cadeia pesada da linha germinativa humana é seleccionada a partir de VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, e VH7-81. Ver PCT WO 2005/005604 para uma descrição das diferentes sequências da linha germinativa.

Em formas de realização particulares, a região variável de cadeia leve e/ou região variável de cadeia pesada compreende uma região estrutural ou pelo menos uma porção da região estrutural (e.g., contendo 2 ou 3 subregiões, tais como FR2 e FR3). Em certas formas de realização, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3, ou FRL4 é totalmente humana. Noutras formas de realização, pelo menos

FRH1, FRH2, FRH3, ou FRH4 é totalmente humana. Nalgumas formas de realização, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3, ou FRL4 é uma sequência da linha germinativa (e.g., linha germinativa humana) ou comprehende sequências de consenso humanas para a estrutura particular. Noutras formas de realização, pelo menos FRH1, FRH2, FRH3, ou FRH4 é uma sequência da linha germinativa (e.g., linha germinativa humana) ou comprehende sequências de consenso humanas para a estrutura particular. Em formas de realização preferidas, a região estrutural é uma região estrutural humana.

Em geral, anticorpos humanizados podem ser produzidos através da obtenção das sequências de ácido nucleico codificando a HCVR e LCVR de um anticorpo, e.g., um anticorpo de murídeo ou anticorpo produzido por um hibridoma, que se liga a um epitopo de miostatina do invento, identificação das CDR nas referidas HCVR e LCVR (não humanas), e enxerto de tais sequências de ácido nucleico codificando CDR em sequências de ácido nucleico codificando estruturas humanas seleccionadas. Opcionalmente, uma região CDR pode ser optimizada através de mutação aleatória ou em localizações particulares para substituir um ou mais aminoácidos na CDR com um aminoácido diferente antes do enxerto da região CDR na região estrutural. Alternativamente, uma região CDR pode ser optimizada após inserção na região estrutural humana utilizando métodos disponíveis a um perito na técnica. De preferência, as sequências de aminoácidos estruturais humanas são seleccionadas de modo a que seja provável que o

anticorpo resultante seja adequado para administração *in vivo* em humanos. Isto pode ser determinado, *e.g.*, com base na utilização anterior de anticorpos contendo tal sequência estrutural humana. De preferência, a sequência estrutural humana não será ela própria significativamente imunogénica.

Alternativamente, as sequências de aminoácidos das estruturas para o anticorpo a humanizar podem ser comparadas com as de sequências estruturais humanas conhecidas, as sequências estruturais humanas a utilizar para o enxerto de CDR e seleccionadas com base nas suas sequências altamente semelhantes às do anticorpo-mãe, *e.g.*, um anticorpo de murídeo que se liga a miostatina. Numerosas sequências estruturais humanas foram isoladas e as suas sequências relatadas na técnica. Isto aumenta a probabilidade de que o anticorpo humanizado resultante enxertado com CDR, que contém CDR do original (*e.g.*, de murídeo) ou CDR optimizadas do anticorpo-mãe enxertadas em estruturas humanas seleccionadas (*e* possivelmente também a região constante humana) retenha substancialmente a estrutura de ligação ao抗原 e mantenha assim a afinidade de ligação do anticorpo-mãe. Para manter um grau significativo de afinidade de ligação ao抗原, as regiões estruturais humanas seleccionadas serão, de preferência, as que se espera que sejam adequadas para administração *in vivo*, *i.e.*, não imunogénicas.

Em qualquer um dos métodos, é obtida a sequência de ADN codificando as regiões HCVR e LCVR do anticorpo

anti-miostatina, de preferência de murídeo. Métodos para a clonagem de sequências de ácido nucleico codificando imunoglobulinas são bem conhecidos na técnica. Tais métodos podem, por exemplo, envolver a amplificação das sequências codificando imunoglobulina a clonar utilizando iniciadores apropriados através de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Iniciadores adequados para amplificação das sequências de ácido nucleico de imunoglobulina e especificamente sequências de HCVR e LCVR de murídeo foram relatados na literatura. Após tais sequências codificando imunoglobulinas terem sido clonadas, elas serão sequenciadas através de métodos bem conhecidos na técnica.

Após as sequências codificando CDR serem enxertadas nas sequências codificando estruturas humanas selecionadas, as sequências de ADN resultantes codificando as sequências variáveis pesadas e variáveis leves "humanizadas" são então expressas para produzir um anticorpo humanizado ou Fv humanizado que se liga a miostatina. A HCVR e a LCVR humanizadas podem ser expressas como parte de uma molécula de anticorpo anti-miostatina inteira, *i.e.*, como uma proteína de fusão com sequências de domínios constantes humanos cujas sequências de ADN de codificação foram obtidas a partir de uma biblioteca comercialmente disponível ou que foram obtidos utilizando, *e.g.*, um dos métodos descritos acima para a obtenção de sequências de ADN, ou conhecido na técnica. No entanto, as sequências de HCVR e LCVR podem também ser expressas na ausência de sequências constantes para produzir um Fv anti-miostatina.

humanizado. No entanto, a fusão de sequências constantes humanas na região variável é potencialmente desejável porque que o anticorpo anti-miostatina humanizado resultante pode possuir funções efectoras humanas.

Os métodos para síntese de ADN codificando uma proteína de sequência conhecida são bem conhecidos na arte. Usando tais métodos, as sequências de ADN que codificam as sequências de HCVR e LCVR humanizadas sujeitas (com ou sem regiões constantes) são sintetizadas, e em seguida expressas num sistema vector adequado para expressão de anticorpos recombinantes. Isto pode ser efectuado em qualquer sistema vector que proporciona que as sequências de HCVR e LCVR humanizadas sujeitas sejam expressas como uma proteína de fusão com sequências de domínios constantes humanas e se associem para produzir anticorpos ou fragmentos de anticorpos funcionais (ligação ao antigénio).

As sequências dos domínios constantes humanos são bem conhecidas na técnica, e foram relatadas na literatura. Sequências da cadeia leve constante humana preferidas incluem as sequências da cadeia leve constante capa e lambda. Sequências da cadeia pesada constante humana preferidas incluem IgG₁ humana, IgG₂ humana, IgG₃ humana, IgG₄ humana e versões mutadas destas que proporcionem uma função efectora alterada, *e.g.*, maior semivida *in vivo*, ligação ao receptor de Fc reduzida, perfil de desamidação alterado e semelhante.

Se presente, as regiões estruturais humanas são de preferência derivadas de uma região variável de anticorpo humano possuindo semelhança de sequência com a região análoga ou equivalente da região de ligação ao antigénio dadora (*i.e.*, o anticorpo-mãe). Outras fontes de regiões estruturais para porções de origem humana de um anticorpo humanizado incluem sequências de consenso variáveis humanas (ver *e.g.*, Kettleborough, C.A. *et al.* *Protein Engineering* 4: 773-783 (1991); Carter *et al.*, WO 94/04679. Por exemplo, a sequência do anticorpo ou da região variável utilizada para obter a porção não humana pode ser comparada com as sequências humanas tal como descrito em Kabat *et al.* "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). Numa forma de realização particularmente preferida, as regiões estruturais de uma cadeia de anticorpo humanizada são derivadas de uma região variável humana possuindo pelo menos cerca de 60% de identidade de sequência global, de preferência pelo menos cerca de 70% de identidade de sequência global e de maior preferência pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência global, com a região variável de um dador não humano. Uma porção humana pode também ser derivada de um anticorpo humano possuindo pelo menos cerca de 65% de identidade de sequência, e de preferência pelo menos cerca de 70% de identidade de sequência, dentro da porção particular (*e.g.*, FR) a utilizar, quando comparada com a porção equivalente (*e.g.*, FR) do dador não humano.

Referências que descrevem ainda métodos envolvidos na humanização de um anticorpo de ratinho que podem ser utilizadas são *e.g.*, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 88: 2869, 1991; Pat. U.S. No. 5693761; Pat. U.S. No. 4816397; Pat. U.S. No. 5225539; programas de computador ABMOD e ENCAD, tal como descrito em Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620, 1983; a humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e coworkers [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)].

Utilizações

Os anticorpos do presente invento são úteis em aplicações terapêuticas, profilácticas e de investigação, tal como aqui descrito. Um anticorpo do invento pode ser utilizado para diagnosticar um distúrbio ou uma doença associada com a expressão da miostatina humana. De um modo semelhante, o anticorpo do invento pode ser utilizado num ensaio para monitorizar os níveis de miostatina num sujeito a ser tratado para uma condição associada a miostatina. A aplicação em investigação inclui métodos que utilizam o anticorpo do invento e um marcador para detectar miostatina numa amostra, *e.g.*, num fluido corporal humano ou num extracto celular ou de tecido. Os anticorpos do invento podem por usados com ou sem modificação, e são marcados através da ligação covalente ou não covalente de uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma que

seja capaz de produzir, quer directa quer indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como, e.g., ^{3}H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, betagalactosidase ou peroxidase de rábano. Qualquer método conhecido na técnica para conjugar separadamente o anticorpo com a porção detectável pode ser empregue, incluindo os métodos descritos por Hunter, et al., *Nature* 144: 945, 1962; David, et al., *Biochemistry* 13: 1014, 1974; Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407, 1982.

Uma variedade de protocolos convencionais para a medição da miostatina, incluindo e.g., ELISA, RIA, e FACS, são conhecidos na especialidade e proporcionam uma base para o diagnóstico de níveis alterados ou anormais de expressão da miostatina. Os valores de expressão normais ou padrão são estabelecidos utilizando qualquer técnica conhecida da especialidade, e.g., através da combinação de uma amostra compreendendo um polipéptido de miostatina, e.g., anticorpos sob condições adequadas para formar um complexo antigénio:anticorpo. O anticorpo é marcado directamente ou indirectamente com uma substância detectável para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não ligado. Substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioactivos.

Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de um material radioactivo incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H . (Ver, e.g., Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", CRC Press, Inc. (1987)). A quantidade de um complexo padrão formado é quantificada através de vários métodos, tais como, e.g., meios fotométricos. Quantidades de polipéptido miostatina expresso em amostras são então comparadas com os valores padrão.

Por uma questão de conveniência, o anticorpo do presente invento pode ser proporcionado num estojo, uma combinação embalada de reagentes em quantidades predeterminadas com instruções para executar o ensaio de diagnóstico. Quando o anticorpo é marcado com uma enzima, o estojo incluirá substratos e cofactores requeridos pela enzima (e.g., um precursor de substrato que proporciona o cromóforo ou fluoróforo detectável). Além disso, podem ser incluídos outros aditivos tais como estabilizantes, tampões (e.g., um tampão de bloqueio ou tampão de lise) e semelhantes. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser amplamente variadas para proporcionar as

concentrações em solução dos reagentes que optimizam substancialmente a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser proporcionados como pós secos, usualmente liofilizados, incluindo excipientes que em dissolução proporcionarão uma solução reagente possuindo a concentração apropriada.

Utilizações Terapêuticas para o Anticorpo

A miostatina desempenha um papel no desenvolvimento muscular e vários distúrbios ou doenças relacionados. Em adultos, o ARNm da miostatina é detectado principalmente no músculo esquelético, embora concentrações mais baixas sejam também encontradas no tecido adiposo e no tecido cardíaco (Sharma, M., et al., *J. Cell Physiol.* 180: 1, 1999). Ratinhos *knock-out* para miostatina têm duas a três vezes mais massa muscular do que os seus companheiros de ninhada de tipo selvagem. O aumento da massa muscular é o resultado da hipertrofia e hiperplasia das fibras (McPherron, A., et al. *Nature* 387: 83-90, 1997 e Zhu, X. et al., *FEBS Letters* 474: 71). Além disso, os ratinhos *knock-out* para miostatina acumulam menos gordura do que os seus companheiros de ninhada de tipo selvagem, mas de resto parecem normais e saudáveis. Recentemente foi também mostrado que a miostatina é um importante regulador da adipogénesis (Rebbapragada, A., et al., *Mol. and Cell. Bio.* 23: 7230-7242, 2003). Além disso, a estrutura e o teor ósseo foram recentemente estudados em ratinhos deficientes em miostatina (Hamrick M.W., et al., *J. Orthopaedic*

Research 21: 1025, 2003; Hamrick, M.W., et al., *Calcif. Tissue Int.* 71: 63, 2002.

Por conseguinte, uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-miostatina do invento pode ser utilizado para aumentar a massa muscular, aumentar a densidade óssea, diminuir a perda muscular, ou poder ser útil para o tratamento ou a prevenção de condições em que a presença de miostatina provoca ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição dos níveis de miostatina tem um benefício terapêutico em mamíferos, de preferência humanos, incluindo, mas não limitado a, perda muscular, lesão muscular, cirurgia, reparação de danos musculares, fragilidade, sarcopenia relacionada com a idade, atrofia por desuso, osteoporose, osteoartrite, crescimento e reparação de ligamentos, obesidade, supressão da acumulação de gordura corporal, obesidade, distrofia muscular de qualquer tipo, miopatia de cuidados intensivos, miopatia alcoólica, caquexia (e.g., relacionada com cancro ou induzida por HIV, ou resultante de DPOC, doença pulmonar crónica, recuperação de sepsia, insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência ou doença cardíaca), síndroma metabólica, perda muscular pós-queimadura, e diabetes tipo II. A atrofia de desuso pode resultar de numerosas causas ou incidentes incluindo qualquer distúrbio ou doença ou estado que conduza a imobilidade prolongada ou desuso ou repouso no leito, incluindo, mas não limitado a, transplante de órgãos sólidos, substituição de articulações, acidente vascular

cerebral, lesão medular, recuperação de queimadura grave, hemodiálise crónica sedentária, recuperação pós-sepsia e exposição a microgravidade. Uma vez que a miostatina é altamente conservada na sequência e função ao longo das espécies, os anticorpos do invento podem ser utilizados para aumentar a massa muscular, aumentar a densidade óssea ou tratar ou prevenir condições em mamíferos não humanos ou espécies aviárias [e.g., animais domésticos (e.g., caninos e felinos), animais de desporto (e.g., equinos), animais fonte de alimento (e.g., bovinos, suíños e ovinos), espécies aviárias (e.g., galinha, peru, outras aves de caça ou de capoeira)], em que a presença da miostatina causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição dos níveis de miostatina tem um benefício terapêutico.

A utilização de um anticorpo monoclonal anti-miostatina do presente invento para tratamento ou prevenção de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados, em que a actividade da miostatina é prejudicial ou que beneficia da diminuição dos níveis de miostatina bioactiva, está aqui contemplada. Adicionalmente, a utilização de um anticorpo monoclonal anti-miostatina do presente invento para utilização no fabrico de um medicamento para o tratamento de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados é contemplada.

Tal como aqui utilizado, os termos "tratamento", "tratar", e semelhantes, referem-se à obtenção de um efeito

farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profiláctico em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou um sintoma desta e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. O "tratamento", tal como aqui utilizado, inclui a administração de um composto do presente invento para o tratamento de uma doença ou condição num mamífero, particularmente num humano, e inclui: (a) prevenção de que a doença ocorra num sujeito que pode estar predisposto à doença mas ainda não foi diagnosticado como a tendo; (b) inibição da doença, *i.e.*, paragem do seu desenvolvimento; e (c) alívio da doença, *i.e.*, causando regressão da doença ou do distúrbio ou aliviando ou sintomas ou complicações destes. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta óptima desejada (*e.g.*, uma resposta terapêutica ou profiláctica). Por exemplo, pode ser administrado um único bolo, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Composição Farmacêutica

Um anticorpo do invento pode ser incorporado em composições farmacêuticas adequadas para administração a um sujeito. Os compostos do invento podem ser administrados sozinhos ou em combinação com um suporte farmaceuticamente aceitável, diluente e/ou excipientes, em doses únicas ou

múltiplas. As composições farmacêuticas para administração são concebidas para serem apropriadas para o modo seleccionado de administração, e diluentes, suportes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes de dispersão, tampões, tensioactivos, conservantes, agentes de solubilização, agentes de isotonicidade, agentes estabilizadores e semelhante são utilizados conforme apropriado. As referidas composições são concebidas de acordo com técnicas convencionais, tal como em, e.g., Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 19^a Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona um compêndio de técnicas de formulação que são geralmente conhecidas dos praticantes.

Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-miostatina do presente invento pode ser administrada a um sujeito em risco de ou exibindo patologias tal como aqui descrito usando técnicas de administração padrão incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, ou em supositório.

Uma composição farmacêutica do invento é de preferência uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilacticamente eficaz" de um anticorpo do invento. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do

anticorpo pode variar de acordo com factores tais como o estado de doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo, são compensados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profiláctico desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profiláctica é utilizada em sujeitos antes ou numa fase precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilacticamente eficaz é pelo menos a dose mínima, mas inferior a uma dose tóxica, de um agente activo que é necessária para conferir o benefício terapêutico a um sujeito. Expresso de outra forma, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo do invento é uma quantidade que, em mamíferos, preferencialmente humanos, aumenta a massa muscular, aumenta a densidade óssea, ou trata condições em que a presença da miostatina causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição nos níveis de miostatina resulta num efeito terapêutico benéfico num mamífero, preferencialmente um humano, incluindo, mas não limitado a, perda muscular, lesão muscular, fragilidade de cirurgia, sarcopenia

relacionada com a idade, atrofia por desuso, osteoporose, osteoartrite, crescimento e reparação de ligamentos, obesidade, supressão da acumulação de gordura corporal, distrofia muscular de qualquer tipo, miopatia de cuidados intensivos, caquexia (e.g., relacionada com cancro ou induzida por HIV, ou resultante de DPOC, insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência ou doença cardíaca), síndroma metabólica e diabetes Tipo II. A atrofia de desuso pode resultar de numerosas causas ou incidentes incluindo qualquer distúrbio ou doença ou estado que leve a imobilidade prolongada ou desuso ou repouso no leito, incluindo, mas não limitado a, transplante de órgãos sólidos, substituição de articulações, acidente vascular cerebral, lesão medular, recuperação de queimadura grave, hemodiálise sedentária crónica, pós-sepsia, recuperação e exposição a microgravidade.

A via de administração de um anticorpo do presente invento pode ser oral, parentérica, através de inalação ou tópica. De preferência, os anticorpos do invento podem ser incorporados numa composição farmacêutica adequada para administração parentérica. O termo parentérico tal como aqui utilizado inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, rectal, vaginal, ou intraperitoneal. A distribuição sistémica periférica através de injecção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é a preferida. Os veículos adequados para tais injecções são simples na técnica.

A composição farmacêutica pode tipicamente ser estéril e estável sob as condições de fabrico e armazenamento no recipiente proporcionado, incluindo e.g., um frasco selado ou uma seringa. Portanto, as composições farmacêuticas podem ser esterilizadas por filtração após a produção da formulação, ou de outra forma tornada microbiologicamente aceitável. Uma composição típica para infusão intravenosa pode ter um volume de tanto quanto 250-1000 ml de fluido, tal como solução de Ringer, solução salina fisiológica, solução de dextrose e solução de Hank e uma dose terapeuticamente eficaz, (e.g., 1 a 100 mg/ml, ou mais) da concentração do anticorpo. A dose pode variar dependendo do tipo e da gravidade da doença. Como é bem sabido nas artes médicas, as dosagens para qualquer sujeito dependem de muitos factores, incluindo o tamanho do doente, a área superficial do corpo, a idade, o composto particular a administrar, o sexo, o tempo e a via de administração, a saúde geral, e outros medicamentos a administrar concomitantemente. Uma dose típica pode ser, por exemplo, no intervalo de 0,001 a 1000 µg; no entanto, estão previstas doses abaixo ou acima deste intervalo exemplar, especialmente considerando os factores acima mencionados. O regime de dosagem parentérica diária pode ser de cerca de 0,1 µg/kg a cerca de 100 mg/kg do peso corporal total, de preferência de cerca de 0,3 µg/kg a cerca de 10 mg/kg e de maior preferência de cerca de 1 µg/kg a 1 mg/kg, ainda de preferência de cerca de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal por dia. O progresso pode ser monitorizado através de avaliação periódica. Para administrações repetidas ao longo de vários

dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não estão excluídos daqui. A dosagem desejada pode ser distribuída através da administração de um único bolo, através de múltiplas administrações de bolo, ou através da administração contínua do anticorpo, dependendo do padrão de decaimento farmacocinético que o praticante deseje atingir.

Estas quantidades sugeridas de anticorpo estão sujeitas a muita discrição terapêutica. O factor chave na selecção de uma dose e programa apropriados é o resultado obtido. Os factores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a tratar, o mamífero particular a tratar, a condição clínica de cada paciente, a causa do distúrbio, o local de distribuição do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, o programa de administração, e outros factores conhecidos dos praticantes de medicina.

Os agentes terapêuticos do invento podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos num suporte estéril adequado antes da utilização. A liofilização e reconstituição podem conduzir a vários graus de perda de actividade do anticorpo. As dosagens podem ter de ser ajustadas para compensar. Geralmente, pH entre 6 e 8 é preferido.

Artigos de Fabrico

Noutra forma de realização do invento, é proporcionado um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento ou a prevenção dos distúrbios ou das condições acima descritos. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição do invento que é eficaz para prevenir ou tratar o distúrbio ou a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha perfurável por uma agulha de injecção hipodérmica). O agente activo na composição é um anticorpo anti-miostatina do invento. O rótulo em, ou associado a, o recipiente indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabrico pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e folhetos com instruções para utilização.

Os seguintes exemplos são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não se destinam a limitar de forma alguma o âmbito do presente invento.

EXEMPLOS**Exemplo 1: Ensaios ELISA****A. Placas revestidas com miostatina e GDF-11**

Fab anti-miostatina quiméricos ratinho/humano do presente invento são testados num ensaio ELISA, em que é medida a ligação do Fab de miostatina madura (forma dimérica) revestida a várias concentrações numa placa de 96 poços. A ligação dos Fab a GDF-11 é também testada.

Cada poço de duas placas de 96 poços é revestido com 50 μ l de miostatina humana recombinante (R&D systems, isenta de suporte, ressupensa primeiro em HCl 4 mM e depois revestida a 1 μ g/ml em tampão carbonato, pH 9,6) ou 50 μ l de GDF-11 humano recombinante (Peprotech, Inc., Cat. #120-11, isento de suporte, ressuspenso primeiro em HCl 4 mM e depois revestido a 1 μ g/ml em tampão carbonato, pH 9,6). As placas são incubadas a 4°C de um dia para o outro. Os poços são aspirados e lavados duas vezes com PBST (PBS + Tween-20 a 0,1%). As placas são bloqueadas com 200 μ l de tampão de bloqueio por poço (BSA a 1% em PBST durante 1 hora).

Os Fab de extractos periplasmáticos a testar são diluídos em série em PBST. Cinquenta microlitros de cada solução de Fab são adicionados às colunas de placas revestidas com GDF-8 e GDF-11. As placas são incubadas

durante 1 hora à temperatura ambiente. Os poços são então lavados 3 vezes com PBST.

É adicionado a cada poço anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (50 μ l de anti-capa de ratinho AP de cabra (Southern Biotech), diluído 1:1000 em PBST) e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os poços são então lavados 3 vezes com PBST. Cinquenta microlitros de substrato cromogénico (AMP/PMP) são adicionados a cada poço e deixa-se revelar à temperatura ambiente. A absorvância dos poços é lida a uma DO de 560 nm. Para cada Fab é obtida uma curva de titulação e a DO relativa no ponto médio da curva do Fab de referência relatada.

Estes dados demonstram que todos os Fab testados se ligam à miostatina humana madura ligada à placa com reactividade cruzada com GDF11.

B. ELISA de Captura de Fab

Uma placa de 96 poços é revestida com 50 μ l de anticorpo de cabra anti-capa humana a 2 μ g por ml em tampão carbonato. As placas são incubadas a 4°C de um dia para o outro. Os poços são aspirados e lavados duas vezes com PBST (PBS + Tween-20 a 0,1%). As placas são bloqueadas com 200 μ l de tampão de bloqueio por poço (BSA a 1% em PBST durante 1 hora).

Os Fab de extractos periplasmáticos a testar são capturados em colunas nas placas durante 2 horas a 37°C. Após lavagem 3 vezes com PBST, 50 µl de diluições em série de 2 vezes de Miostatina biotinilada (de 100 nM a 780 pM) são adicionadas a cada coluna de Fab capturados e incubadas durante 1 hora a 37°C. A placa é então lavada com PBST e incubada com PBST a 37 graus C durante 1-3 horas.

É adicionada a cada poço Neutravidina conjugada com fosfatase alcalina (Pierce, diluída 1:1000 em PBST) e incubada durante 2 minutos à temperatura ambiente. Os poços são então lavados 3 vezes com PBST. 50 µl de substrato cromogénico (AMP/PMP) são adicionados a cada poço e deixa-se revelar à temperatura ambiente. A absorvância dos poços é lida a uma DO de 560 nm. É relatada a DO relativa em comparação com a DO máxima para o Fab de referência.

Todos os Fab do invento testados ligam-se a miostatina madura humana solúvel.

Exemplo 2 Ensaio de Neutralização da Miostatina

Explantes de ectoderme são removidos de embriões de *Xenopus* no estádio 8-9 de blástula através de procedimentos padrão e cultivados em MBS 0,5× (MBS 1×: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,7 mM, MgSO₄ 1 mM, HEPES 5 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, gentamicina 1:1000 v/v, albumina de soro bovino a 0,1%) com a adição de factor de crescimento (GDF8 ou GDF11) mais ou indicado, durante 18 horas a 18°C, tempo ao fim do qual

os embriões de controlo alcançam o estádio de nêurula inicial (estádio 15-16). Os explantes são fotografados e o comprimento de cada explante é medido usando um algoritmo de análise de imagem concebido para quantificação do polo animal. Os explantes não tratados com factor de crescimento nem Fab (controlos), arredondam-se em bolas de epiderme. A miostatina e GDF-11 induzem mesoderme nestes explantes ectodérmicos o que faz com que os explantes se alonguem e formem estruturas semelhantes a halteres. Os anticorpos ou Fab, quando testados quanto à actividade de neutralização, são adicionados ao meio de cultura contendo miostatina durante toda a duração do período de cultura e é avaliada a sua capacidade para inibir os movimentos de alongamento induzidos pelo factor de crescimento. A miostatina é adicionada aos explantes a 25 ng/ml. Os anticorpos ou Fab a testar são adicionados a 20 µg/ml. Um Fab gerado para um抗ígeno irrelevante é usado como controlo. Um anticorpo monoclonal comercialmente disponível anti-GDF8 de ratinho pode ser testado como controlo, este anticorpo é produzido em cabras imunizadas com GDF8 de ratinho purificado e demonstrado pelo fabricante neutralizar o alongamento dos polos animais de *Xenopus* desencadeado por 25 ng/ml de GDF8 de murídeo quando presente a cerca de 10-20 µg/ml (R&D Systems Cat. #MAB788).

ImagePro (v4.5.1.22, de Media Cybernetics) é utilizado para o processamento de imagem. É escrita uma macro para automatizar o processamento da imagem. A macro processa a imagem e regista o comprimento em unidades de

bits. Métodos de medição alternativos podem ser utilizados tal como é conhecido na técnica. Está contemplado que os anticorpos do invento neutralizam a actividade de GDF8 no ensaio do polo animal.

Exemplo 3: Medição da Afinidade dos Fab

A afinidade (K_D) e as taxas de k_{on} e k_{off} dos Fab anti-miostatina do presente invento são medidas utilizando um instrumento BIACore® 2000 contendo um chip sensor CM4. O BIACore® utiliza as propriedades ópticas de ressonância de plasmão de superfície para detectar alterações na concentração de proteína de moléculas interagindo dentro de uma matriz biossensora de dextrano. Excepto quando mencionado, todos os reagentes e materiais são comprados a BIACore® AB (Upsala, Suécia). Todas as medições são realizadas a 25°C. As amostras contendo Fab são dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 a 0,05% (p/v) e HEPES 10 mM, pH 7,4). A miostatina ou GDF-11 (R&D Systems) é imobilizada em células de fluxo de um chip CM4 utilizando química de acoplamento de aminas. As células de fluxo (1-4) são activadas com uma mistura 1:1 de N-hidroxissuccinimida 0,1 M e 3-(N,N-dimetilamino)propriil-N-etylcarbodiimida 0,1 M a um caudal de 20 µl/min. A miostatina ou GDF-11 (2,5 µg/mL em acetato de sódio 10 mM, pH 4,5) é injectada manualmente ao longo de cada uma das células de fluxo a um caudal de 10 µl/min. A densidade superficial é monitorizada até cada célula de fluxo atingir uma densidade superficial de ≈150 unidades de resposta

(RU). As superfícies são bloqueadas com uma injecção de 50 μ l de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5 (10 μ l/min). Para assegurar a remoção completa de qualquer miostatina ou GDF-11 ligado de forma não covalente, 15 μ l de glicina 10 mM, pH 1,5 são injectados duas vezes. O tampão de corrida utilizado para experiências cinéticas continha HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 a 0,005%.

A recolha de dados da cinética de ligação é realizada ao caudal máximo (100 μ l/min). Cada ciclo de análise consiste em (i) injecção de 250 μ l de um Fab (intervalo de concentração de 50 nM a 0,4 nM em incrementos de diluição de 2 vezes) ao longo de todas as 4 células de fluxo com a célula de fluxo 1 como célula de fluxo de referência, (ii) dissociação em 20 min (fluxo de tampão), (iii) regeneração da superfície de GDF-8 ou GDF-11 com uma injecção de 15 μ l de glicina 10 mM, pH 1,5, (iv) uma injecção de branco de 15 μ l do tampão de corrida, e (v) um tempo de estabilização de 2 min antes do início do próximo ciclo. O sinal é monitorizado como célula de fluxo 2 menos célula de fluxo 1, célula de fluxo 3 menos célula de fluxo 1 e célula de fluxo 4 menos célula de fluxo 1. As amostras e um branco de tampão são injectados em duplicado numa ordem aleatória. Os dados são processados usando o suporte lógico SCRUBBER (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah). A taxa de associação e de dissociação para cada ciclo são determinadas através do ajuste dos dados do biosensor utilizando um modelo de associação simples utilizando ClampXP (Center for

Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah) para extrair as constantes da taxa k_{on} e k_{off} ; a constante de ligação em equilíbrio K_d é calculada utilizando a relação $K_d = k_{off}/k_{on}$. Os Fab 41-1 e 412-6, quando medidos no ensaio acima, têm afinidades para GDF-8 de 4,16 nM ($4,16 \times 10^{-9}$ M) e 0,46 nM ($4,6 \times 10^{-10}$ M), respectivamente, e tinham afinidades para GDF-11 de 8,96 nM e 0,81 nM, respectivamente; a especificidade relativa para ambos os Fab foi de uma preferência de aproximadamente 2 vezes para GDF-8 relativamente a GDF-11. (Tabela 2)

Tabela 2

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

Exemplo 4: Medição da Afinidade dos Mab

As medições de afinidade de ligação para os anticorpos monoclonais inteiros do invento são determinadas utilizando um ensaio Sapidyne KINEXA. Contas de Sepharose de fluxo rápido activadas com NHS (GE Healthcare) são pré-revestidas com um anticorpo do invento (50 μ g de anticorpo anti-miostatina por ml de contas) e bloqueadas com BSA a 10 mg/ml em Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Em seguida, 2 pM, 4 pM, 40

pM de um anticorpo do invento (e.g., 3-74/C1E4) são incubados com várias concentrações (e.g., 2,4 pM a 10 nM, diluições em série) de miostatina em tampão de corrida (PBS, Tween-20 a 0,005% (v/v) e ovalbumina a 1 mg/ml) durante 10 horas à temperatura ambiente. Para determinar o anticorpo livre presente no equilíbrio, cada amostra é passada através das contas revestidas com miostatina. A quantidade de anticorpo ligado às contas é então quantificada através de passagem de uma solução de anticorpo de cabra anti-Fc humano marcado com fluorescência (Cy5) (Jackson Immuno Research) diluído 1:4000 em tampão de corrida sobre as contas. O sinal de fluorescência medido é proporcional à concentração do anticorpo livre no equilíbrio. Cada concentração de miostatina é medida em duplicado. A constante de dissociação em equilíbrio (K_D) é obtida a partir de regressão não linear das curvas de competição, utilizando um modelo de ligação homogénea num local de múltiplas curvas (suporte lógico KINEXA).

A constante da taxa de associação (k_{on}) para a ligação de GDF-8 é também determinada utilizando um ensaio Sapidyne KINEXA. São misturados 2 pM de anticorpo com 20 pM de GDF-8 utilizando as mesmas condições tal como descrito acima. A vários tempos, as amostras são sondadas quanto ao anticorpo livre, utilizando as condições descritas acima para ligação em equilíbrio, e, em seguida, a dependência do tempo resultante é ajustada usando o suporte lógico KINEXA para determinar a taxa de associação (k_{on}). A taxa da constante de dissociação (k_{off}) é calculada utilizando a

expressão $k_{off} = KD \times k_{on}$. O anticorpo monoclonal inteiro 3-74/C1E4 (operativamente ligado a uma região Fc de IgG₄) foi medido utilizando o ensaio descrito, os resultados obtidos estão listados abaixo na Tabela 3.

Tabela 3

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

Exemplo 5 Ensaio Repórter de Miostatina/SBE

Neste ensaio repórter, um plasmídeo codificando um gene repórter, *i.e.*, o gene de luciferase, a jusante de um elemento de ligação a SMAD ("SBE"), mais especificamente (CAGA)₁₂ expressa a proteína luciferase quando uma molécula tal como miostatina, GDF-11, ou outro membro da superfamília de TGF-β se liga ao seu próprio receptor, desencadeando deste modo a sinalização de SMAD que resulta num complexo SMAD fosforilado que é capaz de se ligar a SBE. Foi anteriormente relatado que a sequência CAGA é uma sequência que responde a TGF-β dentro do promotor do gene induzido por TGF-β PAI-1 (Denner *et al.*, *EMBO J.*, 17: 3091-3100, 1998). A quantidade de miostatina activa exposta às células é directamente proporcional à quantidade de enzima luciferase produzida que é directamente proporcional à quantidade de luz produzida e mensurável. A presença de um

inibidor (*e.g.*, um anticorpo que se liga a miostatina) reduz a quantidade de miostatina capaz de activar o SBE que finalmente resulta numa diminuição da produção de luz. Este ensaio é também descrito na Publicação Internacional Número WO 2004/037861.

Está contemplado que um Ensaio Repórter de Miostatina/SBE não está limitado às condições exactas aqui descritas, outros tipos de células podem ser utilizados, *e.g.*, células 293HEK (ATCC) ou de rabdomiossarcoma A204 (ver, *e.g.*, Whittemore, *et al.*, BBRC, 200: 965-7.1, 2003); outros tipos de repórteres podem ser utilizados, *e.g.*, CAT, β -gal, GFP, e podem ser utilizadas outras condições de crescimento para as células e condições de ensaio incluindo quantidades variáveis de miostatina na reacção. Um perito na técnica seria facilmente capaz de discernir se um ensaio cai dentro do âmbito de um ensaio repórter de miostatina/SBE por ter um vector compreendendo um elemento SBE a montante de um gene repórter introduzido numa célula hospedeira, em que o elemento SBE utilizado é responsável à SMAD produzida em resposta à ligação de miostatina ao receptor da miostatina. R.S. Thies, *et al.*, *Growth Factors*, 18: 251-259, 2001, descrevem um ensaio semelhante, enquanto Whittemore, L. *et al.*, BBRC, 300: 965-971, 2003 descrevem a resposta do elemento SBE à SMAD produzida em resposta à ligação da miostatina ao seu receptor.

Neste ensaio células 293E (Edge Biosystems) num balão T-75 são criadas em meio DMEM/F12 (1:1) (Gibco 10565-

042) e FBS a 10%. As células são transfectadas com uma mistura de 100 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-019), 5 ml de OptiMEM I (Gibco 51985-034) e 30 μ g de ADN de SB-luciferase durante 4 horas a 37°C. A mistura de transfecção é removida e, em seguida, adicionado meio completo durante 1 hora a 37°C. As células são então tratadas com tripsina e ressuspensas em meio completo a 2×10^6 células/ml e 50 μ l plaqueados em cada poço de uma placa Biocoat de 96 poços (BD 35-6461) e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Após a incubação estar completa, o meio é substituído por 100 μ l de cada Fab a testar que é diluído em série 1:2 e pré-incubado durante 1 hora a 37°C com uma solução 1:1 de 40 ng/ml de miostatina (R&D Systems) em meio completo.

A placa é deixada de um dia para o outro a 37°C, CO₂ a 5% e no dia seguinte 100 μ l de uma mistura 1:1 de Tampão de Lise Glo e reagente Luciferase Bright-Glo (Promega) é adicionado a cada poço e misturado através de pipetagem. A partir desta mistura, são transferidos 150 μ l para uma placa de 96 poços branca e a luminescência é medida utilizando um luminômetro. A luminescência é então traçada contra a concentração de Fab e é calculada a IC₅₀ para cada Fab para miostatina e GDF-11.

Os Fab testados usando as condições acima descritas produziram os valores de IC₅₀ listados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4

Fab	IC ₅₀ de GDF8	IC ₅₀ de GDF11
41H-A7	10 nM	40 nM
41L3F12	40 nM	100 nM
41C1A2	1 nM	1,2 nM
41C1A4	1 nM	2 nM
41C1E4	1 nM	4 nM
41C12A4	1 nM	4 nM
41C2A4	1 nM	4 nM
3-74/C1E4	1 nM	4 nM

Exemplo 6 Farmacocinética

A farmacocinética (PK) dos anticorpos do invento pode ser avaliada em ratinhos C57B6/SCID, a uma dose de 1 mg/kg após uma única administração intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP). Os animais recebem uma mistura de anticorpo não marcado e marcado com ¹²⁵I a uma dose descrita acima e a concentração sérica é determinada com base na radioactividade de ¹²⁵I no soro e na actividade específica da dose injectada. A concentração sérica do anticorpo administrado por via IV ou IP *versus* o tempo é traçada.

Exemplo 7 Efeito *in vivo* na Massa e Força Muscular

Para determinar se um anticorpo do invento bloqueia a actividade da miostatina *in vivo*, um anticorpo

do invento pode ser testado em ratinhos SCID adultos. Os ratinhos SCID sofrem de deficiência imunitária combinada grave e, portanto, não geram uma reacção imunológica após a injecção de um anticorpo do invento. A massa muscular é utilizada como um indicador para a actividade da miostatina em ratinhos tratados com um anticorpo do invento.

Fêmeas de ratinhos SCID/CB17 (Taconic Biotechnology) são pesadas e distribuídas por grupos de dez. Um anticorpo do invento (41C1E4) em tampão PBS é injectado subcutaneamente nos ratinhos, a várias doses (10, 5 e 2 mg/kg) nos dias 0 e 7. Num grupo de controlo, IgG a 10 mg/kg é injectado por via subcutânea em ratinhos nos dias 0 e 7. No dia 14, a força muscular, a resistência do membro dianteiro, é medida com um medidor de teste de força de preensão (e.g., modelo 1027 csx, Columbus Instruments). Os animais são terminados e a massa muscular é avaliada através de ressonância magnética nuclear (RMN). Os pesos frescos do músculo gastrocnémio e dos quadríceps são também tomados bem como o peso corporal. Os resultados, as médias e os erros padrão para os vários parâmetros são tal como é mostrado na Tabela 5 abaixo. Os dados são transformados através de um método de transformação Box Cox para normalizar os dados. Os valores extremos para cada parâmetro são identificados por meio de estatística com o suporte lógico JMP 5.1 (SAS, Inc.) e excluídos do conjunto de dados. A significância estatística foi determinada através de análise ANOVA e teste t de Student. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo. O

anticorpo testado a 5 mg/kg e 10 mg/kg resulta em resultados estatisticamente significativos relativamente ao grupo de controlo de IgG para todos os parâmetros testados. O anticorpo testado a 2 mg/kg resulta em resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo de controlo de IgG para os parâmetros de RMN de Músculo, peso fresco dos quadríceps e peso fresco do gastrocnélio.

Tabela 5

Grupo de Estudo	PC Inicial (g)	PC Final (g)	RMN do Músculo (g)	P fresco dos quadríceps (mg)	P fresco do gastrocnélio (mg)	Força de Prensão (Newtons)
IgG de Controlo	19,82 ± 0,35	20,89 ± 0,33	15,17 ± 0,27	159,92 ± 4,13	92,84 ± 1,99	2,89 ± 0,08
41C1E4 2 mg/kg	19,92 ± 0,32	21,78 ± 0,22	16,27 ± 0,13	172,07 ± 1,53	102,13 ± 0,88	2,99 ± 0,07
41C1E4 5 mg/kg	19,94 ± 0,34	21,9 ± 0,37	16,54 ± 0,39	185,27 ± 4,67	108,16 ± 2,3	3,23 ± 0,04
41C1E4 10 mg/kg	19,9 ± 0,34	22,3 ± 0,4	16,99 ± 0,27	190,03 ± 3,2	109,5 ± 2,03	3,18 ± 0,08
PC = peso corporal						

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> Anticorpos Anti-Miostatina

<130> X-17251

<140> US 60/725738

<141> 2005-10-12

<160> 158

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<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> Construção sintética

<400> 5

gaggtgaagc tgggggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggact cactttcagt aggtatggca tgtcttgggt tcgcccagact 120

ccggagagga ggctggagtg ggtcgagcc attaatagtc atgggtggtag cacctactat 180

tcagacactg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acagccttgtt attactgtgc aagacttccg 300

gactactggg gccaaggcac cacggtcacc gtttcctca 339

<210> 6

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 6

gaaaatgtgc tgacccagtc tecagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60

atgacctgca gggccagctc aagtgttaatg tccagttact tgcactggta ccagcagaag 120
 tcaggtgcct cccccaaact ctggatctat agcacatcca acttggcttc tggagtcct 180
 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagtgtggag 240
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtagtgc gttaccactt cacgttcggc 300
 tcggggacca agctggaaat gaaa 324

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

<220>
 <223> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção sintética

<400> 11

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

<210> 12

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

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..C3
<223> X é S ou L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é S ou Q

<400> 12
Arg Ala Xaa Xaa Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 13
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 14
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 15
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 16
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asn
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 17
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 18
Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 19
Ser Thr Ser Asn Leu Val Phe
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 20

Ser Thr Ser Asn Leu Thr Trp
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 21

Ser Thr Ser Asn Leu Met Asp
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 22

Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr
1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 23

Ser Thr Ser Asn Leu Val Trp
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 24

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 25
Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 26
Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 27
Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Phe Phe Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 28
Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln Phe Thr
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 29

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 30

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 31

Gln Leu Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 32

Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 33

Gln His Tyr Leu Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 34

Gln His His Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 35

Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Trp Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 36

Gln Trp Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Q, N, H, L, P ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y ou H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é S ou L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é H, F, Q ou T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é F ou W

<400> 37
Gln Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus sp.*

<400> 38
Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 39
Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 40
Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Pro Met Ser
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 41

Gly Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X é T ou N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X é G, T ou P

<400> 42

Gly Leu Xaa Phe Ser Arg Tyr Xaa Met Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 43

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

Gly

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 44

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

Gly

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção sintética

<400> 53
Ala Ile Asn Ser 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção sintética

<400> 61

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

Gly

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 62

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

Gly

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 63

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

Gly

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 64

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

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 65

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

Gly

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 66

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

<220>
<223> Construção sintética

<400> 67

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

Gly

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 68

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

Gly

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<400> 69

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

Gly

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

<220>

<223> Construção sintética

<400> 70

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

Gly

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X é A, R ou H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X é I ou Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X é N, T ou K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X é S ou A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X é H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I ou E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X é G ou S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X é Y ou K

<400> 71

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

Gly

<210> 72

<211> 4

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 72

Leu Pro Asp Tyr
1

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 73

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

Gly

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 74

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 76

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 77

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 77

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

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

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 78
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construção sintética

<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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 83

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 84

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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

<220>

<223> Construção 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

<210> 86

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 86

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

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

20

25

30

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 87

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 89

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 89

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

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

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 91

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 93

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 95

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 96

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 97

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 99

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 100

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 103

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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> Construção 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> Construção sintética

<400> 105

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção sintética

<400> 106

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção sintética

<400> 107
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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

<220>

<223> Construção sintética

<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

<220>

<223> Construção sintética

<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 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> Construção 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

<220>

<223> Construção 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

<210> 115

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<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> Construção 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> Construção sintética

<400> 117

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

<220>

<223> Construção sintética

<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> Construção sintética

<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção sintética

<400> 120

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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

<220>

<223> Construção sintética

<400> 121

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção sintética

<400> 122

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção 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

<210> 124

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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> Construção sintética

<400> 125

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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> Construção 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

<210> 127

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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	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> 132

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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> Construção 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> Construção 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> Construção sintética

<400> 135

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly Gly 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> Construção sintética

<400> 136

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly Gly 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> Construção 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> Construção 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> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 141

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 142

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção 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 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

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 146

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

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 147

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

<210> 148

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 148

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 149

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 149

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 150

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<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

<213> *Homo sapiens*

<400> 151

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 152

<211> 32

<212> PRT

<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

<210> 153

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 153

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X é A, V, T, ou M

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é S, A, T, N, W, D ou Y

<400> 154

Ser Thr Ser Asn Leu Xaa Xaa
1 5

<210> 155

<211> 106

<212> PBT

<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

<210> 156

<211> 315

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 156

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgtatg agcagttgaa atctggaaact 60

ggcttcttta tatccctact gaataacttc tatcccaagat agcccaaaat acagtggaaat 120

getting a good grade in math is important for your future success in life.

gtggataaacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 180

gacagcacct acagccttag cagcacccctg acgcgtgagca aagcagacta cgagaaaacac 240

aaagtctacg cctqcqaagt caccatcaq qqccctqaqct cqccccqtac aaaaqaqcttc 300

aacaggggggag agcgc 313

<210> 157

211 315

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 157

gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccc	ccatctgatg	agcagttgaa	atcttggaaact	60
gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaaag	120
gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	180
gacagcacct	acagcctcag	cagcacccctg	acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	240
aaagtctacg	cctgcgaagt	caccatcag	ggcctgagct	cgcccgtaac	aaagagcttc	300
aacaggggag	agtgc					315

<210> 158

<211> 970

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 158

ggcccatcg	tcttcccgt	agcgccctgc	tccaggagca	cctccgagag	cacagccgccc	60
ctgggctgccc	tggtcaagga	ctacttcccc	gaaccgggt	cggtgtcg	gaactcaggc	120
gccctgacca	gcggcgtgca	cacccccc	gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	180
gctcagcagc	gtggtgaccg	tgcctccag	cagcttgggc	acgaagacct	acacctgcaa	240
cgtagatcac	aagcccagca	acaccaaggt	ggacaagaga	gttgagtcca	aatatggtcc	300
cccatgccc	ccctgcccag	cacctgagtt	cctgggggg	ccatcagtct	tcctgttccc	360
cccaaaaccc	aaggacactc	tcatgatctc	ccggacccct	gaggtcacgt	gcgtgggt	420
ggacgtgagc	caggaagacc	ccgaggc	gttcaactgg	tacgtggatg	gcgtggaggt	480
gcataatgcc	aagacaaagc	cgccccgg	gcagttcaac	agcacgtacc	gtgtggtcag	540
cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaacggcaag	gagtacaagt	gcaaggctc	600
caacaaaggc	ctcccgctt	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaagccaaag	ggcagcccc	660
agagccacag	gtgtacaccc	tgcctccatc	ccaggaggag	atgaccaaga	accaggtcag	720
cctgacctgc	ctggtaaaag	gtttctaccc	cagcgcacatc	gccgtggagt	ggaaagcaa	780
tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctccgt	ctggactccg	acggctc	840
cttcctctac	agcaggctaa	ccgtggacaa	gagcagg	tggagggga	atgtttctc	900
atgtccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacaca	cagaagagcc	tctccctgtc	960
tctgggttga						970

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo de miostatina compreendendo um polipéptido da região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 98 e um polipéptido da região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 138.

2. Anticorpo de miostatina de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo compreende ainda uma região constante de cadeia pesada seleccionada a partir de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM e IgD.

3. Anticorpo de miostatina de acordo com a reivindicação 2, em que a região constante presente no anticorpo é originária do genoma de um animal seleccionado a partir de animais domésticos, animais de desporto e animais fonte de alimento.

4. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Composição farmacêutica da reivindicação 4 compreendendo ainda um suporte farmaceuticamente aceitável.

6. Anticorpo de miostatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5 para utilização como medicamento.

7. Anticorpo de miostatina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5 para utilização em tratamento ou prevenção de uma ou mais condições seleccionadas a partir de fragilidade, caquexia, perda muscular, fraqueza muscular, miopatia, distrofia muscular, osteoporose, DPOC, insuficiência ou doença renal, insuficiência ou doença hepática, insuficiência cardíaca, diabetes tipo II ou síndroma metabólica.

Lisboa, 9 de março de 2015

FIG. 1 Promiostatina

1	NGKLOLCVYI YLPMLIVAGP VOLNENSEQK ENVEKEEILCN	40
41	ACTINRQNTAS SRIEAIKIQI LSKLRLIETAP NISKDVIQQL	80
81	LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSGSLSLEDQD YHATTEIIT	120
121	MPTESDFLMQ VDGKPNCCFF KFSKIQYNN VVKAQLNIVL	160
161	RPVETFTTVP VQILRLIKEPN KDGTRYTRIR ELKLIMNPCT	200
201	GINQSIDVKT VLQNNLQDPS SNLGISIKAL DENGKISAVT	240
241	PPGSGEDGLN PPLEVKVTDT PKRSRRDPGL DCDEHSTBRR	280
281	CCRYPLTVDF KAFGMDWIA PFKTRKANTCS GECEFYFLQK	320
321	YPTHTNLVHQA MPPGSAGFCG TPTKMSPINN LYFNGKEQIT	360
361	YGKIPAMVVD RCGCS 376 (SEQ ID NO:1)	

FIG. 2 Miostatina Madura (humana, murideo, rata, galinha, peru, cão, cavalo, porco)

1	DPGILOCDENS TESRCRCRYPPL TVDFEARFQWID WIIAPKRYKA	40
41	NYCSECECFV FLQKYPNTHL VHORNPSRER GSCCTPTEME	80
81	SPINMLYFNGK EKITYGKIPA MVVDRCGCS 109 (SEQ ID NO:2)	

FIG. 3 Miostatina Madura

galinha	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	58
cão	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
cavalo	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
ovella	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
vaca	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
porco	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
galinha	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	109 SEQ ID
cão	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	2
cavalo	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	2
ovella	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	2
vaca	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	2
porco	LVRQANPRGSAGFCCTPTKNSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS	2

FIG. 4 Miostatina: Homeologia com GDF-11

1	DPGILDCDENSTESRCRCRYPPLTVDFEARFQWIDIIAPKRYKANYCSECEFPVFLQKYPNTH	
2	SPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS (SEQ ID NO:2)	
3	SPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS (SEQ ID NO:4)	
4	SPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVDRCGCS (SEQ ID NO:4)	

FIG. 5 Anticorpo-mãe**YN41 ADN de HCVR**

5' - GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGGCTGGAGGGTC
 CCTGAAACTCTCCCTGTGCAGCCCTCTGGACTCRCTTCAGTAGGTATGGCA
 TGTCTTGGTTCCGCCAGACTCOGGACAGGAGGCTGGACTGGGTGGCAGCC
 ATTAATAGTCATGGTGTTAGCACCTACTATTCAAGACACTGTGAAGGGCG
 ATTCAACCATTTCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAATGA
 ACAGTCTGGGTCTGAGGACACAGCCTTGTTATTACTGTGCAAGACTTCGG
 GACTACTGGGGCCAAGGCACCAAGGTCAACCGTTTCTCA (SEQ ID NO: 5)

YN41 Aminoácidos de HCVR

EVKLVESGGG LVKPGSILKL SCAASGLTFS RYGMNSVROT PERRLENVAAR
 INSHGGSTYY SDTVKGRFTI SRDNAXNLY LQMNLSRSED TALYYCARLP
 DYNMQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 7)

YN41 ADN de LCVR (caps)

5' - GAAATGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCATGCATCTCCAGGGCA
 AAGGTCAACCATGACCTGCGAGGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTCCAGTTACT
 TGCACACTGGTACCCAGCAGAAGTCAGGTGCCCTCCCCAAACTCTGGATCTAT
 AGCACACATCCAACCTTGGCTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCACTGGCACTGG
 GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATG
 CTGCCCACCTTAACTCUCACAGCAGTACACTGGTTACCAACTTCACCTTCCGC
 TGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA (SEQ ID NO: 6)

YN41 Aminoácidos de LCVR (caps)

ENVLTOSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYIHWYQDK SGASPKLNIY
 ETSNLASGVF ARFSGSGSCT SYSLTISSVS AEDAAATYYCO QYSGYHFTFG
 SGTKLEMK (SEQ ID NO: 8)

FIG. 6 Abaixamento das CDR da Cadeia Leve

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
YH41	RASSEVSESSYLH	8	STENLAA	13	QHYSGYHFT	24
41-1	RASSEVSESSYLH	10	STENLAA	14	QHYSGYHFT	25
41-2	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	26
41-3	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	27
41-4	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	28
41-5	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	29
41-6	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	28
41-7	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	30
41-8	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
41-9	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	29
41-10	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	29
41-11	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	31
41-12	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	28
41-13	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
41-14	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	29
41-15	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
41-16	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
41-17	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	23
41-18	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	16	QHYSGYHFT	25
41-19	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	16	QHYSGYHFT	25
41-20	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	28
411-1	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	13	QHYSGYHFT	25
411-2	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-3	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-4	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
411-5	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
411-6	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	25
411-7	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	17	QHYSGYHFT	25
411-10	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	16	QHYSGYHFT	25
411-11	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
411-12	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
411-13	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	15	QHYSGYHFT	25
411-15	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	32
411-16	RASSEVSESSYLH	9	STENLAA	14	QHYSGYHFT	32
412-1	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
412-2	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHVLGYHFT	33
412-3	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
412-4	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHVLGYHFT	33
412-5	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHVLGYHFT	33
412-6	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHVLGYHFT	33
412-7	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-8	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-9	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-10	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-11	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-12	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-13	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-14	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-15	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVLGYHFT	33
412-16	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	14	QHVSGYHFT	25
412-A1	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	19	QHYSGYHFT	25
412-A2	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	20	QHYSGYHFT	25
412-A3	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	21	QHYSGYHFT	25
412-B1	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	22	QHYSGYHFT	25
412-B2	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	23	QHYSGYHFT	25
412-F12	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	34
413-G2	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	35
413-G6	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	36
413-A7	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
413-B8	RASSEVSESSYLH	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25

FIG. 6 Continuação

41H-D6	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-D11	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E11	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E5	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E7	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E9	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E12	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F10	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F12	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
41C1A2	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHYSGYHFT	25
41C1A4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHHSGYHFT	34
41C1C1	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	35
41C1E4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHHSGYHFT	34
41C2A1	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	35
41C2A4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHHSGYHFT	36
41C2E4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHYSGYHFT	35
41C2G6	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHYSGYHFT	35
3-74/C1A2	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHYSGYHFT	35
3-74/C1A4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	22	QHHSGYHFT	34
3-74/C1E4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHYSGYHFT	25
3-74/C2A4	RASSSVSSSYLN	9	STENLVA	18	QHHSGYHFT	36
Conservado		RAK,X,SVSSSYLN	12	STENLX,X, X ₁ :S on L X ₁ :S on Q	154	QX,X,X,GYX,X,T 37 X ₁ :Q,W,H,L,P on W X ₁ :Y on H X ₁ :S on L X ₁ :H,F,Q on T X ₁ :F on W

FIG. 7. Atribuições das CMEs de Goiás Previsão

PDB	CONE	S200		S201		S202	
		100	100	100	100	100	100
41-1	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	43	LFDY	72	
41-2	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
41-3	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	45	LFDY	72	
41-4	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	46	LFDY	72	
41-5	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	46	LFDY	72	
41-6	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	46	LFDY	72	
41-8	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	47	LFDY	72	
41-9	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	48	LFDY	72	
41-10	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	48	LFDY	72	
41-11	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	48	LFDY	72	
41-12	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	49	LFDY	72	
41-13	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	50	LFDY	72	
41-14	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
41-16	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	51	LFDY	72	
41-17	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	52	LFDY	72	
41-18	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	53	LFDY	72	
41-19	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	54	LFDY	72	
41-20	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	54	LFDY	72	
411-1	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	55	LFDY	72	
411-2	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
411-4	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	45	LFDY	72	
411-5	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	45	LFDY	72	
411-6	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	45	LFDY	72	
411-7	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	56	LFDY	72	
411-10	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
411-11	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	57	LFDY	72	
411-12	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	53	LFDY	72	
411-13	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	58	LFDY	72	
411-14	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	59	LFDY	72	
411-16	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-1	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-5	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-6	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
412-8	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-9	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	61	LFDY	72	
412-11	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-14	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-15	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
412-16	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	44	LFDY	72	
4121-81	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4122-82	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4122-83	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4122-83	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4122-88	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4123-812	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4123-92	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4123-93	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4123-93	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
4123-97	GLTPPRTYVKG	40	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
412-98	GLTPPRTYVKG	61	AIRNSQHHTTYISCTVKG	60	LFDY	72	
412-99	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	61	LFDY	72	
412-101	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	62	LFDY	72	
412-101	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	62	LFDY	72	
412-104	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	64	LFDY	72	
412-105	GLTPPRTYVKG	38	AIRNSQHHTTYISCTVKG	65	LFDY	72	

FIG 7 Continuação

41H-E7	GLTFPSRYGMS	38	AIKASCGSTTYYSQTVKG	66	LPOY	72
41H-E9	GLTFPSRYGMS	38	AIKESCGSTTYYSQTVKG	67	LPOY	72
41H-E12	GLTFPSRYGMS	38	AIKESCGSTTYYSQTVKG	68	LPOY	72
41H-F10	GLTFPSRYGMS	38	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	69	LPOY	72
41H-F12	GLTFPSRYGMS	38	AQTSQCGSTTYYSQTVKG	70	LPOY	72
41C1A2	GLTFPSRYFMS	40	KITTSQCGSTTYYSQTVKG	63	LPOY	72
41C1A4	GLTFPSRYFMS	40	KITTSQCGSTTYYSQTVKG	63	LPOY	72
41C1C1	GLTFPSRYFMS	40	AIKESCGSTTYYSQTVKG	61	LPOY	72
41C1E4	GLTFPSRYFMS	40	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	60	LPOY	72
41C2A1	GLTFPSRYFMS	40	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	60	LPOY	72
41C2A4	GLTFPSRYFMS	40	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	60	LPOY	72
41C2B4	GLTFPSRYFMS	40	AIKESCGSTTYYSQTVKG	61	LPOY	72
41C3E8	GLTFPSRYFMS	40	KITTSQCGSTTYYSQTVKG	63	LPOY	72
3-74/C1A3	GLTFPSRYFMS	40	KITTSQCGSTTYYSQTVKG	63	LPOY	72
3-74/C1A4	GLTFPSRYFMS	40	KITTSQCGSTTYYSQTVKG	63	LPOY	72
3-74/C1E4	GLTFPSRYFMS	40	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	60	LPOY	72
3-74/C3A4	GLTFPSRYFMS	40	AITTSQCGSTTYYSQTVKG	60	LPOY	72
Consenso	GLX ₁ FSRYX ₁₄ S	42	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₆ STX ₇ YSDTVKG	71		
	X ₁ : T or Y		X ₂ : A, R or H			
	X ₃ : G, F or P		X ₄ : I or Q			
			X ₅ : D, T or K			
			X ₆ : S or A			
			X ₇ : R, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I or E			
			X ₈ : C or S			
			X ₉ : Y or K			

2000-01-001

Constante Capa (seq. ID no. 155)

VAAAPSVF1FFFFSDEQLKSGTASVVCLLNNTYFREAKVQWVQVDNALQSGNSQESVTEQDS
KOSTYSSLSSTLTLSKADYEHKXVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

ADN de Constante Capo (SDC ID No. 156)

GTGGCTTGACCACTCTGCTTCATTTCCGCCATCTGATAGACGAGTTGAAATCTGGAACT
GCCCTTTTTTTTGTGCGTGTTGAAATACCTCTGATATCCGAGGCGCAGACTACAGTGAG
CTTGAAATACGCCCTGCAATCGCGTACTCTGAGGAGTTCTCAACAGCGAGGACAGCAG
GACAGGACCTACAGGCTCAGCAGCGCCTGAGGAAAGSCAGACTACGAGAACAC
AAAGCTTAACGCCCTGGAAATCTACGTTTCAAGGCTCTGAGCTCGCCCTCACAGAGCTTC
ACGAGGAGGAGCTTC

100045->P Dalm K (SSC ID NO: 157)

GPSVFFPLAPCSRSTSESTAAAGCLVNDYFFEPYTVSWNSGALTSGVHHTPPAVLQSSGLYS
LSSWVTVPSSESLOTKTYTCVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLQGSPVFLPP
FKPKDITLM1SERTEBVTCVAVDVSQEDPFRVQPNWYVIGVEVHNAAKTKPREEQPNSTTYKVVS
VLTIVLHODWLNKGSTYRKCKVSNEGLFSB1EKTLSKAKGQFEEPDVYTLFPPQEEMTKIVVS
LTCVLVKGPFYFEDIAVEWEESSQOPENNYKTTTPVLDSDGEFFFLYSRILTVDKSRWQSGHNVFB
CSVNTMIALIINHHTOKS1GLSLG

1994S - a 4.0N de P Delta X (880 ID NO: 158)

Fig. 9. Atributos de Sequências de Cadeias Líeves

© 2007 by the Board of Trustees of the University of Illinois. All rights reserved.

PE1951755

۱۱/۱۱

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 200201891350 A
- US 4816667 A
- US 6545806 A; Lomberg
- US 5545807 A; Surana
- EP 0125023 B1
- US 4816397 A
- EP 0120694 B1
- WO 9601533 A
- EP 0184276 B1
- US 5225539 A
- EP 0239400 B1
- US 5985088 A
- US 5698762 A
- US 4846778 A; Ladner
- US 6284471 B
- US 5807715 B
- US 4816567 B
- US 4816397 B
- WO 2005017604 A
- WO 9404879 A; Carter
- US 5893761 A
- WO 2004037861 A
- US 6072573 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- GRAY, A.; MASTON, A. *Science*, 1990, vol. 247, 1328
- ZIMMERS et al. *Science*, 2002, vol. 296, 1486-1486
- MCPHERRON et al. *Nature*, 1997, vol. 387, 83-90
- SCHEULKE et al. *New Eng. J. Med.*, 2004, vol. 350, 2662
- KIM et al. *BBRC*, 2001, vol. 281, 902-906
- MCPHERRON, A.; LEE S-J. *JCI*, 2002, vol. 109, 595
- HAMRICK, M. *Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 272, 369-91
- HAMRICK et al. *Calif Tissue Int.*, 2002, vol. 71, 63
- MCPHERRON et al. *PNAS*, 1997, vol. 94, 12457-61
- NAKASHIMA et al. *Mech. of Development*, 1999, vol. 80, 185
- MCPHERRON et al. *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, 260
- ESQUELA; LEE. *Dev. Biol.*, 2003, vol. 257, 356
- HARMON et al. *Devpt*, 2004, vol. 131, 6163
- KIM, J. et al. *Science*, 2005, vol. 308, 1927-1930
- CLARKSON, C. et al. *Mol. Immun.*, 1993, vol. 30, 1195-1204
- KABAT. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991
- AL-LAZIKANI et al. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 273, 927-948
- PLUCKTHUN. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 289-318
- GEYSEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 3938-3942
- KABAT et al. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1971, vol. 190, 382-93
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. NIH Publication No. 91-2342, 1991
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495
- JAKOBOWITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-2555
- JAKOBOWITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0058]
- BIRD, R. E. et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-428
- MATTHEWS DJ; WELLS JA. *Science*, 1993, vol. 260, 1113-7
- HANES et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1998, vol. 95, 14130-5
- SAMUELSON P. et al. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 96, 129-64
- KIEKE MC et al. *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1303-10
- LITTLE M. et al. *Immunity Today*, 2003, vol. 21, 364-70
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 1989
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Association, 1999
- BIRD et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-8

- HUSTON et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, 5879-83
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 562-4
- URLAUB ; CHASIN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, 4216-20
- KAUFMAN ; SHARP. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 169, 601-21
- TAYLOR et al. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 6287-95
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-325
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-606
- NETTLEBOROUGH, C.A. et al. *Protein Engineering*, 1991, vol. 4, 773-783
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. NIH, 1991
- QUEEN et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 2889
- LEVITT, M. *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 169, 605-620
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1989, vol. 339, 1534-1536
- HUNTER et al. *Nature*, 1962, vol. 144, 845
- DAVID et al. *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014
- PAIN et al. *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219
- NYGREN, J. *Histochem. And Cytochem.*, 1982, vol. 30, 467
- ZOLA. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. CRC Press, Inc., 1987
- SHARMA, M. et al. *J. Cell Physiol.*, 1992, vol. 150, 1
- MCPHERRON, A. et al. *Nature*, 1997, vol. 387, 83-80
- ZHU, X. et al. *FEBS Letters*, vol. 474, 71
- REBBAPRAGADA, A. et al. *Mol. and Cell. Bio.*, 2003, vol. 23, 7230-7242
- HAMRICK, M.W. et al. *J. Orthopaedic Research*, 2003, vol. 21, 1025
- HAMRICK, M.W. et al. *Calcif Tissue Int.*, 2002, vol. 71, 63
- Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Co. 1995
- DENNER et al. *EMBO J.*, 1992, vol. 17, 3091-3100
- WHITTEMORE et al. *BBRC*, 2003, vol. 310, 865-7, 8
- K.S. THIES et al. *Growth Factors*, 2001, vol. 18, 251-259
- WITTEMORE, L. et al. *BBRC*, 2003, vol. 310, 865-871