

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

(21) **PI0610248-4 A2**



(22) Data de Depósito: 24/04/2006
(43) Data da Publicação: 08/06/2010
(RPI 2057)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/17
C07K 14/705

(54) Título: **ANTICORPOS CONTRA MIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS, LINHAS CELULARES QUE OS PRODUZEM, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANTES DOS MESMOS BEM COMO SEUS USOS**

(30) Prioridade Unionista: 25/04/2005 US 60/674,933

(73) Titular(es): AMGEN FREMONT INC., PFIZER INC.

(72) Inventor(es): CHIKWENDU IBEBUNJO, EVA ROSE CHIN, JOSEPH ZACHWIEJA, JUNMING YIE, LARRY L. GREEN, PHILIP ALBERT KRASNEY

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006015407 de 24/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/116269 de 02/11/2006

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a anticorpos que incluem anticorpos humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos que se ligam a miostatina, e que funcionam para inibir a miostatina. A invenção também refere-se a anticorpos anti-miostatina humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos. A invenção também refere-se a anticorpos que são anticorpos de cadeia única quiméricos, biespecíficos, derivatizados ou partes de proteínas de fusão. A invenção também refere-se a imunoglobulinas isoladas de cadeia pesada e leve derivadas de anticorpos anti-miostatina humanos e as moléculas de ácido nucleico que codificam tais imunoglobulinas. A presente invenção também refere-se a métodos para fabricar anticorpos antimioestatina humanos, composições que compreendem estes anticorpos e métodos para utilizar os anticorpos e composições para diagnóstico e tratamento. A invenção também se proporciona métodos de terapia genética que utilizam moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e/ou leve que compreendem os anticorpos antimioestatina humanos. A invenção também refere-se a animais transgênicos ou plantas que compreende as moléculas de ácido nucleico da presente invenção.



PI0610248-4

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPOS CONTRA MIOSTATINA**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Um corpo crescente de fato indica que a miostatina (mstn, Fator de Crescimento e Diferenciação 8, ou GDF-8) regula negativamente o crescimento do músculo esquelético. Por exemplo, uma mutação nula de miostatina em uma criança foi associada à hipertrofia muscular substancial sem qualquer anormalidade evidente (Schuelke et al. (2004) Miostatina Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *New Engl. J. Med.* 350:2682-8). Uma correlação negativa entre os níveis de proteína miostatina muscular e massa de músculo esquelético também foi demonstrada (Schulte, J.N. and Yarasheski, K.E. (2001). Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11 Suppl:S111-820; Walker KS et al. (2004) Resistance training alters plasma miostatina but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sports Exerc.* 36(5):787-93.). Por exemplo, há uma expressão aumentada de níveis de miostatina muscular com a idade e a expressão de miostatina aumentada também mostrou contribuir com a atrofia muscular em pacientes infectados com HIV (Gonzalez-cadavid et al. (1998) Organization of the human miostatina gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *PNAS* 95:14938-4321). Ademais, níveis elevados de miostatina foram encontrados em populações idosas. (Yarasheski KE et al., (2002) Serum miostatina-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr. Health Aging.* 6(5):343-8). A miostatina também influencia a massa óssea visto que os camundongos com deficientes de miostatina tiveram a densidade mineral óssea aumentada (Hamrick et al., (2003) Bone Architecture and Disc Degeneration in the Lumbar Spine of Mice Lacking GDF-8 (Miostatina). *J. Orthopaedic Res.* 21: 1025-1032 (e referências neste).

Os anticorpos para circular a miostatina mostraram causar massa muscular aumentada e homeostase da glicose aperfeiçoada em modelos murinos de diabetes melito tipo 2. A inibição de miostatina por injeção ip de

um anticorpo de neutralização aumenta a massa de músculo esquelético, reduz a glicose no sangue em jejum e aperfeiçoa a sensibilidade à glicose em camundongos diabéticos obesos (Li X. et al. (2002) Inhibition of myostatin increases muscle mass and improves glucose sensitivity in obese, diabetic mice. Poster Nº 224, in Keystone Symposia: Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies). Ademais, os camundongos A^y/a são conhecidos por desenvolver resistência à insulina e são usados como um modelo para diabetes tipo 2. Quando os camundongos A^y/a estiverem desprovidos de miostatina por deleção do loco miostatina, estes possuem níveis normais de insulina e glicose alimentados, e níveis de glicose dramaticamente inferiores após uma carga de glicose exógena relativa a camundongos A^y/a normais (McPherron et al. (2002) *J. Clin. Invest.* 109:595-601).

Considerando-se o músculo danoso, defeitos ósseos e metabólicos associados à miostatina, há uma necessidade urgente de anticorpos como compostos terapêuticos que são específicos para miostatina e que impedem ou tratam condições ao reduzir a atividade de miostatina, bem como anticorpos como diagnósticos para identificar indivíduos que estão necessitados de tratamento para reduzir a atividade de miostatina.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona anticorpos antimioestatina, ácidos nucleicos que os codificam, vetores e células hospedeiras para produzir os anticorpos, composições e kits que compreendem os anticorpos e métodos para fabricar e utilizar os anticorpos. Diversas modalidades da invenção descritas nos seguintes parágrafos numerados incluem, porém sem caráter limitativo.

1. Anticorpo monoclonal humano, quimérico ou humanizado ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente à miostatina.

2. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde a miostatina é miostatina humana.

3. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte se liga seletivamente à miostatina através de GDF11 por pelo menos 50 dobras.

4. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 3, onde o dito anticorpo ou parte inibe a ligação de miostatina a um receptor de activina tipo I ou tipo II.

5. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o anticorpo ou parte deste possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

10 (a) concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) se ligar à miostatina substancialmente com o mesmo K_D como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; e

(d) se ligar à miostatina substancialmente com a mesma dissociação que um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I;

1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I;
2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e
2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

5 6. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno
deste que compreende:

(a) um conjunto de CDR, CDR1, CDR2, e CDR3, que de forma
seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de
aminoácido a CDRs de cadeia pesada, CDR1, CDR2, e CDR3, de forma se-
qüencial juntamente, que estão incluídos na seqüência de aminoácido esta-
10 belecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73,
77, 81, 85 e 118;

(b) um conjunto de CDR, CDR1, CDR2, e CDR3, que de forma
seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de
aminoácido a CDRs de cadeia leve, CDR1, CDR2, e CDR3, de forma
15 seqüencial juntamente, que estão incluídos na seqüência de aminoácido
estabelecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71,
75, 83, 87 e 120; ou

(c) um primeiro conjunto de CDR de (a) e um segundo conjunto
de CDR de (b).

20 7. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno
deste de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo compreende CDRs
de cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3, que de forma seqüencial junta-
mente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs
de cadeia pesada, CDR1, CDR2, e CDR3, de forma seqüencial juntamente,
25 que estão incluídos na seqüência de aminoácido estabelecida em qualquer
uma entre SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 e 118.

8. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno
deste de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo compreende CDRs
de cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3, que de forma seqüencial juntamente
30 são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs de ca-
deia leve, CDR1, CDR2, and CDR3, de forma seqüencial juntamente, que
estão incluídos na seqüência de aminoácido estabelecida em qualquer uma

entre SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 83, 87 e 120.

5 9. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada encontradas em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 ou 118.

10 10. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve encontradas em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87 ou 120.

15 11. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende uma cadeia pesada que utilize um gene V_H 1-02 humano, um gene V_H 3-21 humano ou um gene V_H 3-23 humano.

20 12. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende uma cadeia leve que utiliza um gene V_K L2 humano, um gene V_K A3 humano ou um gene V_K A30 humano.

25 13. Um anticorpo monoclonal de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende um domínio V_H pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácido ao domínio V_H em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 ou 115.

30 14. Um anticorpo monoclonal de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno compreende um domínio V_L pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácido ao domínio V_L em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 ou 117.

35 15. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1 que se liga especificamente à miostatina, onde:

(a) a cadeia pesada compreende as seqüências de aminoácido

CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) a cadeia leve compreende as seqüências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; ou

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b).

16. Um anticorpo monoclonal de acordo com o parágrafo 12 que compreende adicionalmente um domínio V_L pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácido ao domínio variável em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 ou 117.

17. Um anticorpo monoclonal selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

(c) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

(e) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20;

(f) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido

estabelecidas em SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

(g) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

(h) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

(i) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

(j) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e (l) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas em SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

18. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação deste selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

(c) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

(e) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20;

(f) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ

ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

(g) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

5 (h) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

(i) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ
10 ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

(j) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ
15 ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e

(l) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

20 19. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste que compreende um primeiro conjunto de seqüência que compreende um primeiro conjunto de seqüência CDR que compreende um primeiro CDR1, primeiro CDR2 e primeiro CDR3 e um segundo conjunto de seqüência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo
25 CDR3, onde o cada dito primeiro conjunto CDR e dito segundo conjunto CDR de forma seqüencial possuem juntamente pelo menos 90% de identidade com as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de:

- 30 (a) SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente;
(b) SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, respectivamente;
(c) SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12, respectivamente;
(d) SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:16, respectivamente;

- (e) SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:20, respectivamente;
- (f) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:24, respectivamente;
- (g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:28, respectivamente;
- (h) SEQ ID NO:30 e SEQ ID NO:32, respectivamente;
- (i) SEQ ID NO:34 e SEQ ID NO:36, respectivamente;
- (j) SEQ ID NO:38 e SEQ ID NO:40, respectivamente;
- (k) SEQ ID NO:42 e SEQ ID NO:44, respectivamente; e
- (l) SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117, respectivamente.

20. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste que compreende um primeiro conjunto de sequência CDR que compreende um primeiro CDR1, primeiro CDR2 e primeiro CDR3 e um segundo conjunto de sequência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo CDR3, onde cada dito primeiro conjunto CDR e dito segundo conjunto são as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de

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

21. Um anticorpo monoclonal que se liga especificamente à miostatina que compreende o conjunto de sequência de aminoácido de cadeia pesada estabelecida em SEQ ID NO:115 e o conjunto de sequência de aminoácido de cadeia leve estabelecidos em SEQ ID NO:117.

22. Um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de anti-

geno deste que compreende as regiões variáveis contidas em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

23. Um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste, que se liga especificamente à miostatina que compreende CDRs
5 CDR1, CDR2 e CDR3 contidos em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

24. Um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste sendo que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno se liga a partes de peptídeo 1 e peptídeo 5 de miostatina, onde o peptídeo 1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103 e
10 peptídeo 5 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 107.

25. Um anticorpo produzido por uma célula que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

15 26. Composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

27. Uma composição farmacêutica de acordo com o parágrafo 26, que compreende adicionalmente pelo menos um agente terapêutico.

20 28. Método que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25 ou a composição farmacêutica de acordo com o parágrafo 26, onde o dito anticorpo, parte de ligação de antígeno ou composição farmacêutica inibe a atividade de miostatina, onde o dito indivíduo
25 está necessitado de aumento de massa muscular, promoção de desenvolvimento de músculo esquelético, tratamento de um distúrbio de atrofia muscular ou aumento de crescimento de músculo esquelético.

29. Linha celular isolada que produz um anticorpo ou uma parte de anticorpo de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25 ou a cadeia pesada ou cadeia leve do dito anticorpo ou da dita parte de ligação de antígeno.
30

30. Molécula de ácido nucléico isolada que compreende uma

seqüência de nucleotídeo que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação de antígeno desta ou a cadeia leve ou uma parte de ligação de antígeno desta de um anticorpo de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25.

5 31. Vetor que compreende a molécula de ácido nucléico de acordo com o parágrafo 30, onde o vetor compreende opcionalmente uma seqüência de controle de expressão ligada de forma operável à molécula de ácido nucléico.

10 32. Célula hospedeira que compreende o vetor de acordo com o parágrafo 31 ou a molécula de ácido nucléico de acordo com o parágrafo 30.

15 33. Método para produzir um anticorpo antimiostatina ou uma parte de ligação de antígeno deste, que compreende cultivar a célula hospedeira de acordo com o parágrafo 32 ou a linha celular de acordo com o parágrafo 29 sob condições adequadas e recuperar o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno.

34. Organismo transgênico não-humano que transporta o ácido nucléico de acordo com o parágrafo 30 tanto cromossomicamente como extracromossomicamente, onde o organismo transgênico não-humano expressa o dito ácido nucléico.

20 35. Método para isolar um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente à miostatina, que compreende a etapa de isolar o anticorpo do organismo transgênico não-humano de acordo com o parágrafo 34.

25 36. Método para tratar um indivíduo necessitado deste com um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente à miostatina que compreende as etapas de:

(a) administrar no dito indivíduo uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico isolada de acordo com o parágrafo 30; e

(b) expressar a dita molécula de ácido nucléico.

30 37. Método para produzir um anticorpo monoclonal humano que se liga especificamente à miostatina, que compreende as etapas de:

(a) imunizar um animal transgênico não-humano que é capaz de

produzir anticorpos humanos com miostatina, uma parte imunogênica de miostatina, ou uma célula ou tecido que expressa miostatina;

(b) permitir que o animal transgênico não-humano estabeleça uma resposta imune à miostatina;

5 (c) isolar os linfócitos B do animal transgênico não-humano; e

(d) isolar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente à miostatina dos ditos linfócitos B isolados.

38. Anticorpo isolado produzido pelo método de acordo com o parágrafo 37.

10 39. Método para inibir a ligação de miostatina a células que expressam um receptor de activina Tipo II ou IIB que compreende colocar a miostatina em contato com um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

15 40. Método para aumentar a proliferação de mioblasto que compreende colocar uma composição que compreende mioblastos e miostatina em contato com um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

20 41. Método que compreende administrar em um indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno deste de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina, onde o dito indivíduo está necessitado de aperfeiçoamento de homeostase da glicose, redução de massa de
25 gordura, aumento da sensibilidade à insulina, aperfeiçoamento de função de rim, redução de acúmulo de gordura, tratamento, prevenção ou inibição de uma doença ou condição caracterizada por perda óssea, sendo que a dita doença ou condição inclui osteoporose, osteopenia, osteoartrite e fraturas ósseas, tratamento de síndrome metabólica, ou neutralização de atrofia
30 muscular a partir de administração prolongada de um glucocorticóide ou um hormônio esteróide durante o tempo em que o indivíduo está submetido ao tratamento com um glucocorticóide ou um hormônio esteróide.

42. Método para reduzir a atividade de miostatina em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

43. Método para reverter o declínio relacionado à idade em massa muscular em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

44. Método para aumentar a proliferação de mioblasto e diferenciação em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

45. Método para reduzir a sinalização celular mediada por receptor de membrana de activina induzida por miostatina tipo IIA ou IIB em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

46. Método para reduzir a ativação mediada por miostatina de um receptor de membrana de activina tipo I em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

47. Método para reduzir a fosforilação mediada por miostatina de uma ou mais proteínas R-smad selecionadas a partir do grupo que consiste em: Smad 2 e Smad 3 em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 18, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

48. Método para aumentar a expressão de um gene selecionado a partir do grupo que consiste em: myoD, myf5 e miogenina, em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

49. Método para promover o crescimento muscular, ganho de peso ou auxílio na prevenção de fraqueza no gado, suíno, carneiro, frangos, perus, cavalos, peixe, cães e gatos necessitados deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

50. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO:47;

(b) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:49 e SEQ ID NO:51;

(c) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 53 e SEQ ID NO:55;

(d) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:57 e SEQ ID NO:59;

(e) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:61 e SEQ ID NO:63;

(f) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em

SEQ ID NO:65 and SEQ ID NO:67;

(g) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:69 and SEQ ID NO:71;

5 (h) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:73 e SEQ ID NO:75;

(i) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em
10 SEQ ID NO:77 e SEQ ID NO:79;

(j) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:81 e SEQ ID NO:83; e

(k) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que
15 compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO:85 e SEQ ID NO:87; e

(l) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas em SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO:120.

20 51. Método para tratar síndrome metabólica em um indivíduo necessitado deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, onde o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

25 52. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo humano, quimérico ou humanizado que concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno deste, onde o anticorpo ou parte deste possui pelo menos uma propriedade selecionada a
30 partir do grupo que consiste em:

(a) concorrer para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1;

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

- 5 (b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

- 10 (c) se ligar à miostatina substancialmente com o mesmo K_D como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M; L-F58I, I85V, I85V; e

- 15 (d) se ligar à miostatina substancialmente com a mesma dissociação que um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M; L-F58I, I85V.

- 25 53. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste que concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo que compreende:

- 30 (a) uma cadeia pesada que utiliza um gene V_H 1-02 humano, um gene V_H 3-21 humano ou um gene V_H 3-23 humano; e

(b) uma cadeia leve que utiliza um gene V_K L2 humano, um gene V_K A3 humano ou um gene V_K A30 humano.

54. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do dito anticorpo monoclonal que possui a mesma seqüência de aminoácido que o anticorpo produzido por uma linha de célula de hibridoma que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

55. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam um anticorpo que possui a mesma seqüência de aminoácido que o anticorpo produzido por uma célula de hibridoma que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

56. Método que compreende expressar o dito anticorpo monoclonal humano na dita linha de célula hospedeira de mamífero de qualquer um dos parágrafos 52 a 55 e recuperar o dito anticorpo monoclonal humano.

57. Linha de célula de hibridoma selecionada a partir do grupo que consiste em Números de Designação de Depósito ATCC PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

58. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo monoclonal humano, quimérico ou humanizado, onde o anticorpo ou parte deste possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) concorrer para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em :1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-

L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) é um anticorpo que possui a mesma sequência de aminoácido que o anticorpo produzido por uma célula de hibridoma que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576; e

(d) é uma linha de célula de hibridoma selecionada a partir do grupo que consiste em Números de Designação de Depósito ATCC PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra os resultados de uma análise de gene repórter responsivo à miostatina. Como mostrado, os anticorpos antimioestatina de neutralização inibem a atividade da luciferase induzida por miostatina em células A204. As variantes de anticorpo humano 1_116_1L-Q45K; 1_257-1L-L21I; 1_314_1H-T92A e 2_112_1H-I12V, L-F 58I, I85V inibiram a atividade da luciferase na mesma magnitude que os anticorpos de tipo selvagem.

A Figura 2 mostra os resultados de uma análise de beta-lactamase L6 Aurora. Como mostrado, os anticorpos antimioestatina de neutralização inibem a atividade da beta-lactamase induzida por miostatina em mioblastos de rato L6. As variantes de anticorpo humano 1_116_1L-Q45K; 1_257-1L-L21I; 1_314_1H-T92A e 2_112_1H-I12V, L-F58I, I85V inibiram a atividade de beta-lactamase na mesma magnitude que os anticorpos de tipo selvagem.

A Figura 3 mostra os resultados de uma análise de western blot. Como mostrado, os anticorpos antimiostatina de neutralização da invenção inibem a fosforilação de smad2 induzida por miostatina em células HepG2 por análise de western blot.

5 A Figura 4 mostra os resultados de análises de expressão de mRNA myf5. (A) Os anticorpos antimiostatina de neutralização 1_268_1, 2_177_1, e 2_112_1 recuperaram a expressão de gene myf5 inibida por miostatina em mioblastos de camundongos C2C12, enquanto que um anti-
 10 corpo de não-neutralização 1_159_1 não poderia fazer o mesmo. O nível de mRNA Myf5 foi detectado por PCR TaqMan. (B) 1_116_1 resgatou a expressão de gene myf5 de maneira dose-dependente.

A Figura 5 mostra os resultados de análises de diferenciação de célula muscular C2C12. (A) Os anticorpos anti-miostatina de neutralização 2_43_1, 1_314_1, e 1_257_1 resgataram a diferenciação de músculo blo-
 15 queada por miostatina em células musculares em camundongos C2C12. O nível de proteína de cadeia pesada de miosina embriônica (MHC) utilizou um marcador para medir a diferenciação de C2C12. (B) Os anticorpos 2_112_1, 1_46_1, e 1_116_1 resgataram a diferenciação de músculo de C2C12 blo-
 queada por miostatina.

20 A Figura 6 (A) ilustra os peptídeos gerados de GDF8 madura (SEQ ID NO: 89) para testar a ligação de anticorpo anti-miostatina. Os aminoácidos em letras minúsculas são os aminoácidos que são diferentes de GDF11 (B). Sumário de ligação de peptídeo. Como mostrado na Figura, alguns anticorpos não se ligam a nenhum dos peptídeos. Alguns anticorpos se
 25 ligam a peptídeos não-contíguos. (C) A estrutura previamente diagnosticada GDF8 com a ilustração de ligação de peptídeo dos anticorpos anti-miostatina humanos. A estrutura GDF8 foi gerada utilizando SWISS-MODEL; um servi-
 dor de modelagem de homologia de estrutura de proteína completamente automatizado, acessível através do servidor da web ExPASy, ou a partir do
 30 programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer). Os primeiros sete aminoácidos estavam ausentes da estrutura previamente diagnosticada. GDF8 madura é uma proteína homodímera. Apenas uma subunidade é mostrada. Os

anticorpos descritos aqui se ligam a GDF8 como um homodímero. Como mostrado na Figura, os anticorpos monoclonais humanos 2_43_1, 2_112_1 e 2_177_1 se ligam tanto ao peptídeo 1 como 5. Os peptídeos 1 e 5 estão espacialmente próximos, porém não em estrutura primário.

5 A Figura 7 mostra as seqüências de aminoácido de peptídeos 1 a 11 e identificadores de seqüência correspondentes (SEQ ID NOs 103-113).

10 A Figura 8 mostra a ligação de epítipo. A ligação de epítipo dos anticorpos anti-miostatina humanos da invenção foi mapeada por experimentos de concorrência cruzada que utilizam um instrumento BIAcore® 3000. Os anticorpos são mostrados como caixas rotuladas. Os anticorpos em um círculo competem com anticorpos em círculos sobrepostos. Por exemplo, o anticorpo 1_46_1 compete com o anticorpo 1_136_3, porém o anticorpo 1_46_1 não compete com o anticorpo 1_268_1. Quando dois ou mais
15 anticorpos estiverem no mesmo círculo, sua respectiva ligação não pode ser distinguida.

 A Figura 9 mostra os resultados de um estudo de imunoprecipitação para testar a capacidade que os anticorpos anti-miostatina humanos da invenção têm para abaixar o complexo latente de
20 GDF8 madura e GDF8/propeptídeo maduro. O meio condicionado que contém células 293T transfectadas com GDF8 foi usado. Como mostrado na Figura, os anticorpos 2_112_1, 2_43_1 e 2_177_1 abaixaram GDF8 madura, complexo de GDF8 madura/propeptídeo, e GDF8 não-processada; o anticorpo 1_66_1 abaixou complexo de GDF8 madura e GDF8/propeptídeo ma-
25 duro; nenhum outros anticorpo abaixou GDF8 madura, propeptídeo, ou GDF8 não-processada. Viela 4 é o controle de carregamento de meio 1/10, e a viela 7 é o controle de imunoprecipitação apenas com meio.

 A Figura 10 mostra os resultados de um estudo de uma imunoprecipitação para testar a capacidade que os anticorpos anti-miostatina da
30 invenção têm para abaixar GDF8 madura de soro de camundongo. Como mostrado na Figura, os anticorpos 2_112_1, 2_43_1 e 2_177_1 abaixaram GDF8 madura do soro de camundongo, enquanto que os anticorpos 1_116_1 e 1_66_1 não poderiam fazer isto.

1_116_1 e 1_66_1 não poderiam fazer isto.

A Figura 11 é um alinhamento de sequência de GDF8 e GDF11 humana madura. GDF8 (SEQ ID NO: 89) e GDF11 maduras (SEQ ID NO: 90) partilham aproximadamente 90% de seqüências de aminoácido idênticas. Tanto GDF8 como GDF11 maduras formam homodímeros. Tanto GDF8 como GDF11 maduras possuem nove cisteínas, que formam quatro ligações de bissulfeto internas e uma ligação de bissulfeto intermolecular. Como mostrado na Figura, as cisteínas que formam uma ligação de bissulfeto umas com as outras são marcadas com os mesmos pontos ou sinais de adição. Uma cisteína (cys73) que forma a ligação de bissulfeto intermolecular foi marcada com uma estrela. A estrutura de GDF8 foi prognosticada utilizando SWISS-MODEL (vide Figura 6C).

A Figura 12 é uma tabela que resume os dados de análise *in vitro*.

A Figura 13 é uma tabela que resume o uso de gene, ligação de epítipo e ligação peptídica.

As Figuras 14 e 15 mostram os efeitos sobre a massa muscular em camundongos após o tratamento *in vivo* com anticorpos anti-miostatina como comparado com o veículo para os músculos gastrocnemius-plantaris-soleus (GPS), tibiais anteriores (TA) e quadríceps (Quads).

A Figura 16 mostra os efeitos sobre o peso e resistência muscular em camundongos SCID após o tratamento *in vivo* com um anticorpo anti-miostatina (2_112_K).

A Figura 17 ilustra os efeitos sobre o peso muscular em camundongos SCID após o tratamento *in vivo* com doses variadas de um anticorpo anti-miostatina (2_112_K).

A Figura 18 é uma análise de resposta de dose (A) e concentração (B) de doses variadas de um anticorpo anti-miostatina (2_112_K) e seus efeitos sobre o peso muscular.

A Figura 19 é um alinhamento das regiões variáveis de cadeia pesada e leve de anticorpos 2_112_1 (cadeia pesada: SEQ ID NO:77; cadeia leve: SEQ ID NO:79) e 2_112_K (cadeia pesada: SEQ ID NO:118; ca-

deia leve: SEQ ID NO:120).

A Figura 20 mostra os efeitos sobre a massa muscular (A) e massa adiposa (B) em camundongos após o tratamento *in vivo* com cortisona com um anticorpo anti-miostatina (2_112_K) como comparado com o veículo para os músculos gastrocnemius-plantaris-soleus (GPS), tibiais anteriores (TA) e quadríceps (Quads) (em 20A) e as massas inguinais, epididimais e de placa de gordura abdominal (em 20B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições e Técnicas Gerais

Salvo definição em contrário aqui, os termos científicos e técnicos usados em conjunto com a presente invenção devem possuir os significados que são comumente compreendidos pelos versados na técnica. Ademais, salvo requerido em contrário pelo contexto, os termos no singular devem incluir pluralidades e os termos no plural devem incluir o singular. Geralmente, a nomenclatura usada em conjunto com, e técnicas de, cultura celular e de tecido, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química de proteína e ácido nucléico e hibridização descritas aqui são aquelas bem-conhecidas e comumente usadas na técnica.

Os métodos e técnicas da presente invenção são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem-conhecidos na técnica e conforme descrito em diversas referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo, salvo indicação em contrário. Veja, por exemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) e Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), incorporados aqui à guisa de referência. As reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante, conforme comumente realizadas na técnica ou como descrito aqui. A nomenclatura usada em conjunto com, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica descritas aqui são aquelas

tica, e química medicinal e farmacêutica descritas aqui são aquelas bem-conhecidas e comumente usadas na técnica. As técnicas padrão são usadas para síntese química, análise química, preparação, formulação, e entrega farmacêutica, e tratamento de pacientes.

5 Os seguintes termos, salvo indicação em contrário, devem ser entendidos com os seguintes significados:

O termo "polipeptídeo" abrange proteínas nativas ou artificiais, fragmentos de proteína e análogos de polipeptídeo de uma sequência de proteína. Um polipeptídeo pode ser monomérico ou polimérico.

10 O termo "proteína isolada", "polipeptídeo isolado" ou "anticorpo isolado" é uma proteína, polipeptídeo ou anticorpo que devido a sua origem ou fonte de derivação (1) não está associado a componentes naturalmente associados que o acompanham em seu estado nativo, (2) está isento de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Desta maneira, um polipeptídeo que é quimicamente sintetizado ou sintetizado em um sistema celular diferente da célula a partir da qual este naturalmente se origina, ficará "isolado" de seus componentes naturalmente associados. Uma proteína também pode ser proporcionada substancialmente isenta de componentes naturalmente associados por isolamento, utilizando técnicas de purificação de proteína bem-conhecidas na técnica.

20 Em diversas modalidades, um anticorpo anti-miostatina isolado é aquele que foi purificado por proteína A (vide, por exemplo, Exemplo XVI), um que foi sintetizado por um hibridoma ou outra linha celular *in vitro*, e/ou
25 um anticorpo anti-miostatina humano derivado de um camundongo transgênico.

Uma proteína ou polipeptídeo é "substancialmente puro", "substancialmente homogêneo", ou "substancialmente purificado" quando pelo menos 60 a 75% de uma amostra exibir uma única espécie de polipeptídeo.
30 O polipeptídeo ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Um polipeptídeo ou proteína substancialmente puro irá compreender tipicamente cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% peso/peso de uma amostra de

proteína, mais geralmente cerca de 95%, e de preferência será mais de 99% puro. A pureza ou homogeneidade de proteína pode ser indicada por inúmeros meio bem-conhecidos na técnica, tal como eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguida por visualização de uma
5 única faixa de polipeptídeo através de coloração do gel com uma coloração bem-conhecida na técnica. Para certos propósitos, uma resolução superior pode ser proporcionada utilizando HPLC ou outros meio bem-conhecidos na técnica para purificação.

O termo "organismo transgênico não-humano" como usado aqui
10 se refere a qualquer criatura viva individual transgênica não-humana, inclusive um animal transgênico não-humano, planta, bactéria, protista, ou fungo.

O termo "fragmento de polipeptídeo" como usado aqui se refere a um polipeptídeo que possui uma deleção amino-terminal e/ou carboxi-terminal, porém onde a seqüência de aminoácido restante é idêntica às po-
15 sições correspondentes na seqüência naturalmente ocorrente. Em algumas modalidades, os fragmentos possuem pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento. Em outras modalidades, os fragmentos possuem pelo menos 14, pelo menos 20, pelo menos 50, ou pelo menos 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento.

O termo "análogo de polipeptídeo" como usado aqui se refere a um polipeptídeo que compreende um segmento que possui identidade substancial a uma parte de uma seqüência de aminoácido e que possui pelo menos uma das seguintes propriedades: (1) ligação específica à miostatina sob condições de ligação adequadas, (2) capacidade de inibir ou ativar
25 miostatina. Tipicamente, os análogos de polipeptídeo compreendem uma substituição de aminoácido conservativa (ou inserção ou deleção) com relação à seqüência nativa. Os análogos possuem tipicamente pelo menos 20 ou 25 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento ou mais, e podem ser
30 geralmente tão longos quanto um polipeptídeo de comprimento total. Algumas modalidades da invenção incluem anticorpos de fragmentos de polipeptídeo ou análogos de polipeptídeo com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, 16 ou 17 substituições da seqüência de aminoácido de linha-gem germinativa.

Em certas modalidades, as substituições de aminoácido por um anticorpo anti-miostatina ou parte de ligação de antígeno deste são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade a proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade a oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos de proteína, e (4) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos, porém ainda mantêm a ligação específica à miostatina. Os análogos podem incluir diversas muteínas de uma seqüência, que não a seqüência normalmente ocorrente. Por exemplo, as únicas ou múltiplas substituições de aminoácido, de preferência, substituições de aminoácido conservativas, podem ser feitas na seqüência normalmente ocorrente, de preferência na parte do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) que forma(m) contatos intermoleculares. Uma substituição de aminoácido conservativa não deve alterar substancialmente as características estruturais da seqüência de origem; por exemplo, uma substituição de aminoácido não deve alterar a estrutura folha- β antiparalela que constitui o domínio de ligação de imunoglobulina que ocorre na seqüência de origem, ou divide outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a seqüência de origem. Em geral, a glicina e prolina não deveriam ser usadas em uma folha- β antiparalela. Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeo reconhecidas na técnica estão descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), incorporados aqui à guisa de referência.

Os análogos não-peptídicos são comumente usados na indústria farmacêutica como fármacos com propriedades análogas àquelas do peptídeo padrão. Estes tipos de composto não-peptídica são chamados de "peptídeo miméticos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger, *TINS* p.392 (1985); and Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), incorporados aqui à guisa de referência. Tais

compostos são geralmente desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular computadorizada. Os peptídeos miméticos que são estruturalmente similares a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo modelo (isto é, um polipeptídeo que possui uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica desejada), tal como um anticorpo humano, porém possui uma ou mais ligações peptídicas substituídas por uma ligação selecionada a partir do grupo que consiste em : $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, e $-\text{CH}_2\text{SO}-$, através de métodos bem conhecidos na técnica. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência consenso por um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina em vez de L-lisina) também pode ser usada para gerar peptídeos mais estáveis. Ademais, peptídeos restritos que compreendem uma variação de sequência consenso ou de sequência consenso substancialmente idêntica podem ser gerados através de métodos conhecidos na técnica (Rizo and Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporado aqui à guisa de referência); por exemplo, ao adicionar resíduos internos de cisteína capazes de formar pontes de bissulfeto intramolecular que ciclizam o peptídeo.

Quando um "anticorpo" for referido aqui com relação à invenção, entende-se normalmente que uma parte de ligação de antígeno deste também pode ser usada. Uma parte de ligação de antígeno compete com o anticorpo intacto para ligação específica. Veja de forma geral, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado à guisa de referência em sua totalidade para todos os propósitos). A parte de ligação de antígenos pode ser produzida por técnicas de DNA recombinante ou clivagem química de anticorpos intactos. Em algumas modalidades, a parte de ligação de antígenos inclui Fab, Fab', F(ab')_2 , Fd, Fv, dAb, e fragmentos de região determinante de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (scFv), anticorpos quiméricos, anticorpos bivalentes e polipeptídeos que contêm pelo menos uma parte de um anticorpo que é

suficiente para conferir ligação de antígeno específica ao polipeptídeo.

A partir de N-terminal até C-terminal, os domínios variáveis tanto de cadeia leve como pesada maduros compreendem, seqüencialmente, as regiões FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio no presente documento está de acordo com as definições de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) ou Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

Como usado aqui, um anticorpo que é referido por número é igual a um anticorpo monoclonal que é obtido a partir do hibridoma do mesmo número. Por exemplo, o anticorpo monoclonal 2_112 é igual àquele anticorpo obtido a partir do hibridoma 2_112, ou um subclone deste, tal como 2_112_1, 2_112_2, e similares. A única exceção é 1_136_3 que é um hibridoma diferente de subclones 1_136_1 e 1_136_2.

Como usado aqui, um fragmento Fd se refere a um fragmento de anticorpo que consiste nos domínios V_H e C_H1; um fragmento Fv consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544 a 546 (1989)) consiste em um domínio V_H.

Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de cadeia única (scFv) onde os domínios V_L e V_H são pareados para formar uma molécula monovalente através de um ligante sintético que permite que estes sejam formados como uma cadeia de proteína única. (Bird et al., *Science* 242:423 a 426 (1988) e Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 a 5883 (1988)). Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos bivalentes, ou seja, anticorpos com duas valências onde os domínios V_H e V_L são expressos sobre uma cadeia de polipeptídeo única, porém utilizando um ligante que é curto o bastante para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, desta forma fazendo com que os domínios sejam pareados com domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno. (Vide por exemplo, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444 a 6448 (1993), e Poljak R. J. et al., *Structure* 2:1121 a 1123 (1994)). Em algumas modalidades, uma ou mais CDRs de um

anticorpo da invenção podem ser incorporadas dentro de uma molécula tanto de forma covalente como não-covalente para tornar esta uma imunoadesina que se liga especificamente à miostatina. Em tais modalidades, a(s) CDR(s) pode(m) ser incorporada(s) como parte de uma cadeia de polipeptídeo maior, pode(m) ser covalentemente ligada(s) a outra cadeia de polipeptídeo, ou pode(m) estar não-covalentemente incorporada(s). Ademais, as regiões de moldura (FRs) podem ser derivadas de um dos anticorpos anti-miostatina a partir dos quais uma ou mais CDRs são obtidas ou a partir de um ou mais anticorpos humanos diferentes.

Em modalidades que possuem um ou mais sítios de ligação, os sítios de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes.

Como usado aqui, o termo "anticorpo humano" significa qualquer anticorpo onde as seqüências de domínio variável e constante são seqüências humanas. O termo abrange anticorpos com seqüências derivadas de (isto é, que utilizam) genes humanos, porém que foram alteradas, por exemplo, para reduzir a possível imunogenicidade, aumentar a afinidade, eliminar as cisteínas que podem causar dobra indesejada, etc. O termo abrange tais anticorpos produzidos de forma recombinante em células não-humanas, que devem conferir glicosilação não típica de células humanas. Estes anticorpos podem ser preparados de uma variedade de maneiras, como descrito abaixo.

O termo "anticorpo quimérico" como usado aqui se refere a um anticorpo que compreende regiões de dois ou mais anticorpos diferentes. Em uma modalidade, uma ou mais CDRs do anticorpo quimérico são derivadas de um anticorpo anti-miostatina humano. Em outra modalidade, todas as CDRs são derivadas de anticorpos anti-miostatina humanos. Em outra modalidade, as CDRs com mais de um anticorpo anti-miostatina humano são combinadas em um anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender uma CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo anti-miostatina humano, uma CDR2 da cadeia leve de um segundo anticorpo anti-miostatina humano e uma CDR3 da cadeia leve de um terceiro anticorpo anti-miostatina humano, e CDRs da cadeia pesada podem ser derivadas de

um ou mais outros anticorpos antimioestatina humanos. Ademais, as regiões de moldura podem ser derivadas de um dos anticorpos antimioestatina humanos a partir dos quais uma ou mais CDRs são obtidas ou a partir de um ou mais anticorpos humanos diferentes.

- 5 Em algumas modalidades, um anticorpo quimérico da invenção é um anticorpo antimioestatina humanizado. Um anticorpo antimioestatina humanizado da invenção compreende a seqüência de aminoácido de uma ou mais regiões de moldura e/ou a seqüência de aminoácido de pelo menos uma parte da região constante de um ou mais anticorpos anti-mioestatina
- 10 humanos da invenção compreende seqüências derivadas de um anticorpo antimioestatina não-humano, por exemplo, seqüências de CDR.

- Os fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser facilmente preparados por um versado na técnica após as instruções deste relatório descritivo. Os amino e carbóxi-terminais
- 15 preferidos de fragmentos ou análogos ocorrem próximos de limites de domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de nucleotídeo e/ou seqüência de aminoácido com bancos de dados de seqüência públicos ou privados. De preferência, os métodos de comparação computadorizados são usados para identificar mo-
- 20 tivos de seqüência ou domínios de conformação de proteína previamente diagnosticados que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Os métodos para identificar as seqüências de proteína que se dobram formando uma estrutura tridimensional são conhecidos. Vide, Bowie et al., *Science* 253:164 (1991).

- 25 O termo "ressonância de plásmon de superfície", como usado aqui, se refere a um fenômeno óptico que permite a análise de interações bioespecíficas em tempo real por detecção de alterações em concentrações de proteína dentro de uma matriz de biossensor, por exemplo, utilizando o sistema BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descrições adicionais, vide Johnsson U. et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19 a 26 (1993); Jonsson U. et al., *Biotechniques* 11:620 a 627 (1991); Jonsson B. et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125 a 131 (1995); e Johnsson
- 30

B. et al., *Anal. Biochem.* 198:268 a 277 (1991).

O termo " K_D " se refere à constante de dissociação em equilíbrio de uma interação anticorpo-antígeno particular.

O termo "dissociação" significa a constante de taxa de
5 dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

O termo "epítopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula-T ou que interage de outra maneira com uma molécula. Os determinantes epitópicos consistem geralmente em agrupamentos de superfície quimicamente
10 ativa de moléculas tais como aminoácidos ou carboidrato ou cadeias laterais de açúcar e possuem geralmente características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Um epítopo pode ser "linear" ou "conformacional". Em um epítopo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e a molécula de interação (tal como um
15 anticorpo) ocorrem de forma linear ao longo da seqüência de aminoácido primária da proteína. Em um epítopo conformacional, os pontos de interação ocorrem através de resíduos de aminoácido sobre a proteína que são separados um do outro. Um anticorpo é considerado para ligar especificamente um antígeno quando a constante de dissociação for ≤ 1 mM, de preferência
20 ≤ 100 nM e mais preferivelmente ≤ 10 nM. Em certas modalidades, K_D é 1 pM a 500 pM. Em outras modalidades, K_D está entre 500 pM a 1 μ M. Em outras modalidades, K_D está entre 1 μ M a 100 nM. Em outras modalidades, K_D está entre 100 mM a 10 nM. Uma vez que determina-se um epítopo desejado sobre um antígeno, é possível gerar anticorpos naquele epítopo, por
25 exemplo, utilizando as técnicas descritas na presente invenção. Alternativamente, durante o processo de descoberta, a geração e caracterização de anticorpos pode elucidar informações sobre epítomos desejados. A partir destas informações, é então possível selecionar de forma competitiva os anticorpos para ligação ao mesmo epítopo. Uma abordagem para obter isto
30 é realizar estudos de concorrência cruzada para encontrar anticorpos que se liga de forma competitiva um ao outro, por exemplo, os anticorpos competem para ligação ao antígeno. Um processo de alto rendimento para "recipiente"

de anticorpos baseados em sua concorrência cruzada está descrito no Pedido de Patente Internacional Nº WO 03/48731.

Como usado aqui, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Veja, Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), incorporado aqui à guisa de referência.

O termo "polinucleotídeo" como referido aqui significa uma forma polimérica de nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ou ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de ambos tipos de nucleotídeo. O termo inclui formas de cadeia simples e dupla.

O termo "polinucleotídeo isolado" como usado aqui significa um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, ou sintética ou algumas combinação destes, que devido à sua origem o " polinucleotídeo isolado" (1) não está associado a todos ou parte de um polinucleotídeo com o qual o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) é ligado de forma operável a um polinucleotídeo ao qual não está ligado em natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "nucleotídeos naturalmente ocorrentes" como usado aqui inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" como usado aqui inclui nucleotídeos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e similares. O termo "ligações de oligonucleotídeo" referido aqui inclui ligações de oligonucleotídeos tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, e similares. Vide por exemplo, LaPlanche et al., *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon et al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp.87 a 108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente Nº U.S. 5.151.510; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), cujas descrições estão incorporadas por meio deste à guisa de referência. Um oligonucleotídeo pode incluir uma marcação para detecção, se desejado.

As seqüências "ligadas de forma operável" incluem tanto seqüências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse como seqüências de controle de expressão que atuam em *trans* ou em uma distância para controlar o gene de interesse. O termo "seqüência de controle de expressão" como usado aqui se refere a seqüências de polinucleotídeo que são necessárias para efetuar a expressão e processamento de seqüências codificantes às quais estas estão ligadas. As seqüências de controle de expressão incluem seqüências de iniciação, término, promotoras e intensificadoras de transcrição apropriadas; sinais de processamento de RNA eficientes tais como sinais de junção e poliadenilação; seqüências que estabilizam o mRNA citoplásmico; seqüências que aumentam a eficiência de tradução (isto é, seqüência consenso Kozak); seqüências que aumentam a estabilidade de proteína; e quando desejado, seqüências que aumentam a secreção de proteína. A natureza de tais seqüências de controle se difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotos, tais seqüências de controle incluem geralmente promotor, sítio de ligação ribossomal e seqüência de término de transcrição; em eucariotos, geralmente, tais seqüências de controle incluem promotores e seqüência de término de transcrição. O termo "seqüências de controle" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para a expressão e processamento, e também podem incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências associadas de fusão.

O termo "vetor", como usado aqui, significa uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual este foi ligado. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo, isto é, uma parte padrão dupla circular de DNA dentro da qual os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral, onde os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados dentro do genoma viral. Em algumas modalidades, os vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira dentro da qual estes são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que possuem uma origem bacteriana de replicação e vetores de mamífero episomal). Em outras modalidades, os veto-

res (por exemplo, vetores de mamífero não-epissomal) podem ser integrados dentro do genoma de uma célula hospedeira mediante introdução dentro da célula hospedeira, e desse modo, são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Ademais, certos vetores são capazes de dirigir a expressão de gene à qual estes estão ligados de forma operável. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão recombinante" (ou simplesmente, "vetores de expressão").

O termo "células hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como usado aqui, significa uma célula dentro da qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que a "célula hospedeira recombinante" e "célula hospedeira" significam não só a célula em questão particular como também a progênie de tal célula. Devido à possibilidade de ocorrer certas modificações em gerações seguintes tanto devido à mutação como a influências ambientais, tal progênie pode não ser, na verdade, idêntica à célula de origem, porém ainda está incluída dentro do escopo do termo "célula hospedeira" como usado aqui.

O termo "se hibridizar seletivamente" referido aqui significa se ligar de forma detectável e específica. Os polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos destes de acordo com a invenção se hibridizam seletivamente em cadeias de ácido nucléico sob condições de hibridização e lavagem que minimizam as quantidades notáveis de ligação detectável a ácidos nucléicos não-específicos. Condições de "alta estringência" ou "altamente estringente" podem ser usadas para obter condições de hibridização seletivas como conhecido na técnica e discutido aqui. Um exemplo de condições de "alta estringência" ou "altamente estringente" é a incubação de um polinucleotídeo com outro polinucleotídeo, onde um polinucleotídeo pode ser adicionado a uma superfície sólida tal como uma membrana, em um tampão de hibridização de 6X SSPE ou SSC, 50% de formamida, 5X de reagente de Denhardt, 0,5% de SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, fragmentado em uma temperatura de hibridização de 42°C durante 12 a 16 horas, após lavar duas vezes a 55°C utilizando um tampão de lavagem de 1X SSC, 0,5% de SDS. Vide também Sambrook et al., supra, pp. 9.50-9.55.

O termo "porcentagem de identidade de seqüência" no contexto de seqüências de ácido nucléico significa os resíduos em duas seqüências que são iguais quando alinhadas para correspondência máxima. O comprimento de comparação de identidade de seqüência pode estar acima de uma
5 extensão de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, geralmente pelo menos cerca de 18 nucleotídeos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 nucleotídeos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleotídeos, mais tipicamente pelo menos cerca de 32 nucleotídeos, e de preferência pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleotídeos. Há inúmeros algoritmos diferentes
10 conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade de seqüência de nucleotídeo. Por exemplo, as seqüências de polinucleotídeo podem ser comparadas utilizando FASTA, Gap ou Bestfit, que são programas no Pacote Wisconsin Versão 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que inclui, por exemplo, os programas FASTA2
15 e FASTA3, proporciona alinhamentos e porcentagem de identidade de seqüência das regiões de melhor superposição entre as seqüências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63 a 98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporados
20 aqui à guisa de referência). Salvo especificação em contrário, os parâmetros padrão de um programa ou algoritmo particular são usados. Por exemplo, a porcentagem de identidade de seqüência entre seqüências de ácido nucléico pode ser determinada utilizando FASTA com seus parâmetros padrão (um tamanho de palavra de 6 e o fator NOPAM para a matriz de contagem) ou
25 utilizando Gap com seus parâmetros padrão como proporcionado em GCG Versão 6.1, incorporado aqui à guisa de referência.

Uma referência a uma seqüência de nucleotídeo abrange seu complemento, salvo especificação em contrário. Desta maneira, uma referência a um ácido nucléico que possui uma seqüência particular deve ser
30 entendida incluindo sua cadeia complementar, com sua seqüência complementar.

Como usado aqui, os termos "porcentagem de identidade de

seqüência" e "porcentagem de homologia de seqüência" são usados de forma intercambiável.

O termo "similaridade substancial" ou "similaridade de seqüência substancial," quando referido a um ácido nucléico ou fragmento deste, significa que quando otimamente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeo apropriadas com outro ácido nucléico (ou sua cadeia complementar), há identidade de seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 85%, de preferência pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente, pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleotídeo, como medido por qualquer algoritmo bem-conhecido de identidade de seqüência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido acima.

Como aplicado a polipeptídeos, o termo "identidade substancial" significa que duas seqüências de peptídeo, quando otimamente alinhadas, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT que utilizam pesos diferenciais como fornecidos com os programas, compartilham pelo menos 70%, 75% ou 80% de identidade de seqüência, de preferência, pelo menos 90% ou 95% de identidade de seqüência, e mais preferivelmente, pelo menos 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Em certas modalidades, as posições de resíduo que não são idênticas se diferem por substituições de aminoácido conservativas. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é aquela onde um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que possui um grupo de cadeia lateral R com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservativa não irá alterar substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Em casos onde duas ou mais seqüências de aminoácidos se diferem uma da outra por substituições conservativas, a porcentagem de identidade de seqüência pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Os meios para fazer este ajuste são bem-conhecidos pelo versado na técnica. Vide, por exemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, va-

lina, leucina, e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais dotadas de amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais acídicas: ácido aspártico e ácido glutâmico; e 7) cadeias laterais dotadas de enxofre: cisteína e metionina. Os grupos de substituição de aminoácidos conservativa são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer alteração que possui um valor positivo na matriz PAM250 de log da verossimilhança descrita em Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), incorporado aqui à guisa de referência. Uma substituição "moderadamente conservativa" é qualquer alteração que possui um valor não-negativo na matriz PAM250 de log da verossimilhança.

A identidade de seqüência de polipeptídeos é tipicamente medida utilizando software de análise de seqüência. O software de análise de proteína adapta seqüências utilizando medidas de similaridade atribuídas a diversas substituições, deleções e outras modificações, inclusive substituições de aminoácido conservativas. Por exemplo, GCG contém programas tais como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros padrão como especificado pelos programas para determinar a homologia de seqüência ou identidade de seqüência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína tipo selvagem e uma muteína da mesma. Vide, por exemplo, GCG Versão 6.1 (University of Wisconsin, WI). As seqüências de polipeptídeo também podem ser comparadas utilizando FASTA que utiliza parâmetros padrão ou recomendados, vide, GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e porcentagem de identidade de seqüência das regiões da melhor superposição entre as seqüências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Outro algoritmo preferido quando se compara uma seqüência da invenção com um

banco de dados que contém um grande número de seqüências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente blastp ou tblastn, que utiliza parâmetros padrão como fornecidos com os programas. Vide, por exemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990);
 5 Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

O comprimento de seqüências de polipeptídeo comparado para homologia será geralmente pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácido, geralmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos, e de
 10 preferência, mais de cerca de 35 resíduos. Quando se examina um banco de dados que contém seqüências de um grande número de organismos diferentes, é preferível comparar a seqüência de aminoácidos.

Como usado aqui, os termos "marcador" ou "marcado" se referem à incorporação de outra molécula no anticorpo. Em uma modalidade, o
 15 marcador é um marcador detectável, por exemplo, a incorporação de um aminoácido radiomarcado ou ligação a um polipeptídeo de porções de biotila que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina que contém um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Em outra moda-
 20 lidade, o rótulo ou marcador pode ser terapêutico, por exemplo, um conjugado de fármaco ou toxina. Diversos métodos para marcar polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, porém sem caráter limitativo, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y ,
 25 ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeo), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimiluminescentes, grupos biotila, epitopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo,
 30 seqüências de par de zíper de leucina, sítios de ligação de anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, marcadores de epitopo), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como toxina da

coqueluche, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, diona antracina diidróxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterona, glucocorticóide, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos destes. Em algumas modalidades, os marcadores são ligados por braços espaçadores de diversos comprimentos para reduzir o congestionamento estérico potencial.

Ao longo deste relatório descritivo e reivindicações, a palavra "compreender," ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo", será entendida por implicar a inclusão de um número inteiro estabelecido ou grupo de números inteiros, porém não a exclusão de nenhum outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

Anticorpos Anti-Miostatina Humanos e Caracterização Destes

A invenção no presente documento proporciona anticorpos anti-miostatina. Em algumas modalidades, os anticorpos são humanos. Em outras modalidades, os anticorpos são humanizados. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-miostatina humanos são produzidos ao imunizar um animal transgênico não-humano, por exemplo, um roedor, cujo genoma compreende genes de imunoglobulina humanos de modo que o animal transgênico produza anticorpos humanos.

Um anticorpo anti-miostatina da invenção pode compreender uma cadeia leve humana kappa ou humana lambda ou uma seqüência de aminoácido derivada deste. Em algumas modalidades que compreendem uma cadeia leve kappa, o domínio variável de cadeia leve (V_L) utiliza um gene V_K A30, A3 ou L2 humano.

Em algumas modalidades, V_L do anticorpo anti-miostatina compreende uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácido (adições) relativas à seqüência de aminoácido V_K de linhagem germinativa. Em algumas modalidades, V_L do anticorpo anti-miostatina compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácido com relação à seqüência de aminoácido V_K . Em algumas modalidades, uma ou mais substituições de linhagem

germinativa está nas regiões de CDR da cadeia leve. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido V_K relativas à linhagem germinativa estão em uma ou mais das mesmas posições que as substituições relativas à linhagem germinativa encontrada em qualquer um dos V_L dos anticorpos proporcionados aqui. Por exemplo, V_L de um anticorpo anti-miostatina da invenção pode conter uma ou mais substituições de aminoácido comparadas com linhagem germinativa encontrada em V_L de anticorpo 1_257_1. Pode haver também uma ou mais substituições de aminoácido comparadas com a linhagem germinativa encontrada em V_L de anticorpo 1_116_1, que utiliza o mesmo gene V_K que o anticorpo 1_257_1. Em algumas modalidades, o aminoácido se altera em uma ou mais das mesmas posições, porém envolve uma substituição diferente daquela no anticorpo de referência. Em todos os casos, a recitação de um clone de anticorpo com traços é equivalente ao mesmo clone de anticorpo com pontos (por exemplo, 1_257_1 = 1.257.1).

Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido relativas à linhagem germinativa ocorrem em uma ou mais das mesmas posições que as substituições de linhagem germinativa em qualquer um dos V_L de anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V, porém as substituições podem representar substituições de aminoácido conservativas em tal(is) posição(ões) relativa(s) ao aminoácido no anticorpo de referência. Por exemplo, se uma posição particular em um destes anticorpos for alterada com relação à linhagem germinativa e para glutamato, alguém pode substituir aspartato naquela posição. De forma similar, se uma substituição de aminoácido comparada com linhagem germinativa em um anticorpo exemplificado for serina, alguém pode substituir de forma conservativa treonina por serina naquela posição. As substituições de aminoácido conservativas são discutidas *supra*, ao longo deste pedido.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-miostatina compre-

ende uma seqüência de aminoácido de cadeia leve selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 e 44. Em outras modalidades, a cadeia leve compreende a seqüência de aminoácido de cadeia leve de anticorpo 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V ou 2_112_1L-F58I, I85V. Em algumas modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-miostatina humano compreende a seqüência de aminoácido V_L de anticorpo 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); ou 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) ou dita seqüência de aminoácido que possui até 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácido conservativas e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não-conservativas. Em outras modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-miostatina humano compreende a seqüência de aminoácido V_L de anticorpo 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V ou 2_112_1L-F58I, I85V. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a seqüência de aminoácido a partir do início da CDR1 até o final da CDR3 de qualquer um dos anticorpos anteriores.

Em algumas modalidades, a cadeia leve pode compreender a seqüência de aminoácidos de regiões CDR1, CDR2 e CDR3 independentemente selecionadas das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve, respectivamente, de dois ou mais anticorpos monoclonais selecionados a partir de 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); ou 1_268_1 (SEQ ID NO: 32), ou cada dita região CDR que possui menos que 3 ou menos que 2 substituições de aminoácido conservativas e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não-conservativas.

Em certas modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-miostatina compreende a seqüência de aminoácidos das regiões CDR1,

CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado a partir de 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1 (SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 44); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); ou 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) ou cada dita região CDR que possui menos que 3 ou menos que 2 substituições de aminoácido conservativas e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não-conservativas.

Com relação à cadeia pesada, em algumas modalidades, o domínio variável (V_H) utiliza um gene V_H 1-02, V_H 3-21 ou V_H 3-23 humano. Em algumas modalidades, a sequência V_H de anticorpo anti-miostatina contém uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácido (adições), coletivamente "mutações", relativas às sequência de aminoácido V_H de linhagem germinativa. Em algumas modalidades, o domínio variável da cadeia pesada compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 mutações da sequência de aminoácido V_H de linhagem germinativa. Em algumas modalidades, a(s) mutação(ões) são substituições não-conservativas comparadas com a sequência de aminoácido de linhagem germinativa. Em algumas modalidades, as mutações estão nas regiões CDR da cadeia pesada.

Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido estão em uma ou mais das mesmas posições que as substituições de linhagem germinativa em qualquer um dos V_H de anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. Em outras modalidades, o aminoácido se altera em uma ou mais das mesmas posições, porém envolve uma substituição diferente daquela no anticorpo de referência.

Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 e 42. Em outra modalida-

des, a cadeia pesada compreende a seqüência de aminoácido de cadeia pesada de anticorpo 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; ou 2_112_1H-I12V. Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende a seqüência de aminoácido V_H de anticorpo 1_116_1 (SEQ ID NO: 2), 1_136_3 (SEQ ID NO: 10), 1_257_1 (SEQ ID NO: 14), 1_46_1 (SEQ ID NO: 22), 2_112_1 (SEQ ID NO: 26), 1_314_1 (SEQ ID NO: 18), 1_66_1 (SEQ ID NO: 34), 2_43_1 (SEQ ID NO: 42), 2_177_1 (SEQ ID NO: 38), 1_132_1 (SEQ ID NO: 6) e 1_268_1 (SEQ ID NO: 30); ou dita seqüência de aminoácido V_H que possui até 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 ou 11 substituições de aminoácido conservativas e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não-conservativas. Em outras modalidades, a cadeia pesada compreende a seqüência de aminoácido V_H de anticorpo 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; ou 2_112_1H-I12V. Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende a seqüência de aminoácido a partir do início da CDR1 até o fim da CDR3 de qualquer um dos anticorpos anteriores.

Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de anticorpo 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V ou cada dita região de CDR que possui menos que 8, menos que 6, menos que 4, ou menos que 3 substituições de aminoácido conservativas e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não-conservativas.

Em algumas modalidades, as regiões de CDR de cadeia pesada são independentemente selecionadas a partir das regiões de CDR de dois ou mais anticorpos selecionados a partir de anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. Em outra

modalidade, o anticorpo compreende uma cadeia leve como descrito acima e uma cadeia pesada como descrito acima. Em uma modalidade adicional, as CDRs de cadeia leve e CDRs de cadeia pesada pertencem ao mesmo anticorpo.

- 5 Em diversas modalidades, os anticorpos anti-miostatina possuem a(s) seqüência(s) de aminoácido de cadeia pesada de comprimento total e de cadeia leve de comprimento total, as seqüências de aminoácidos V_H e V_L, seqüência de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada e CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve ou a seqüência de aminoácido de cadeia pesada a partir do início da CDR1 até o fim da CDR3 e a seqüência de aminoácido de cadeia leve a partir do início da CDR1 até o fim da CDR3 de um anticorpo anti-miostatina proporcionado aqui.

- 15 Um tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é alterar uma ou mais cisteínas no anticorpo, que pode ser quimicamente reativo, a outro resíduo, tal como, sem caráter limitativo, alanina ou serina. Em outra modalidade, há uma substituição de uma cisteína não-canônica. A substituição pode ser feita em uma CDR ou região de moldura de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em algumas modalidades, a cisteína é canônica.

- 20 Outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é remover sítios proteolíticos potenciais no anticorpo. Tais sítios podem ocorrer em uma CDR ou região de moldura de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e remoção de sítios proteolíticos pode reduzir o risco de heterogeneidade no produto de anticorpo e, desta maneira, aumentar sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar os pares asparagina-glicina, que formam sítios de desamidação potenciais, ao alterar um ou ambos os resíduos.

- 25 Em algumas modalidades, a lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-miostatina da invenção é clivada. Em diversas modalidades da invenção, as cadeias pesada e leve dos anticorpos anti-miostatina podem incluir opcionalmente uma seqüência de sinal.

Em um aspecto, a invenção proporciona onze anticorpos monoclonais anti-miostatina humanos inibidores e as linhas celulares de hibridoma que os produz. A Tabela 1 lista os identificadores de sequência (SEQ ID NOs) dos ácidos nucleicos que codificam as cadeias pesada e leve de comprimento total e partes dotadas de domínio variável daquelas cadeias, e a sequência de aminoácido deduzida de comprimento total.

Tabela 1

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

A invenção proporciona adicionalmente variantes de cadeia pesada e/ou leve de certos anticorpos anti-miostatina humanos listados acima, que compreendem uma ou mais modificações de aminoácido. Para designar as variantes, a primeira letra é uma letra que simboliza o aminoácido da cadeia de anticorpo naturalmente ocorrente, o número se refere à posição do aminoácido (onde a posição um é o aminoácido N-terminal de FRI), e a segunda letra é letra que simboliza o aminoácido variante.

A invenção proporciona uma variante de cadeia leve de anticorpo monoclonal 1_116_1 chamada 1_116_1L-Q45K, que possui uma lisina na posição 45 de SEQ ID NO: 4.

Outra variante de cadeia leve é 1_257_1L-L21I, que possui um resíduo de isoleucina na posição 21 de SEQ ID NO: 16.

Uma variante de cadeia pesada de anticorpo monoclonal de 1_314_1 chamada 1_314_1H-T92A, que possui um resíduo de alanina na
5 posição 92 de SEQ ID NO: 18.

A invenção proporciona adicionalmente uma variante de cadeia pesada de anticorpo monoclonal 1_46_1 chamada 1_46_1H-L81M, que possui uma metionina na posição 81 de SEQ ID NO: 22.

A invenção proporciona uma variante de cadeia pesada (I12V) e
10 duas variantes de cadeia leve (F58I e I85V) de anticorpo monoclonal 2_112_1. As variantes de cadeia pesada chamada 2_112_1H-I12V possui uma valina na posição 12 de SEQ ID NO: 26. Uma variante de cadeia leve, 2_112_1L-F85I, possui uma isoleucina na posição 85 de SEQ ID NO: 28. A
15 outra variante de cadeia leve, chamada 2_112_1L-I85V, possui uma valina na posição 85 de SEQ ID NO: 28. A invenção também proporciona uma variante de cadeia leve que compreende ambas mutações, isto é, 2_112_1L-F85I, I85V. A invenção também inclui anticorpos que compreendem a variante de cadeia pesada tanto com uma como ambas mutações de cadeia leve, ou seja, 2_112_1H-I12V, L-F58I; 2_112_1H-I12V, L-I85V; e 2_112_1H-I12V,
20 L-F58I, I85V.

Ainda em modalidades adicionais, a invenção inclui anticorpos que compreendem seqüência de aminoácido de domínio variável com mais de 80%, mais de 85%, mais de 90%, mais de 95%, mais de 96%, mais de 97%, mais de 98% ou mais de 99% de identidade de seqüência com uma
25 seqüência de aminoácido de domínio variável de qualquer anticorpo anti-miostatina humano listado acima.

Classe e Subclasse de Anticorpos Anti-miostatina

A classe e subclasse de anticorpos anti-miostatina podem ser determinadas por qualquer método conhecido na técnica. Em geral, a classe
30 e subclasse de um anticorpo podem ser determinadas utilizando anticorpos que são específicos para uma classe e subclasse particular de anticorpo. Tais anticorpos estão comercialmente disponíveis. A classe e subclasse po-

dem ser determinadas por ELISA, ou Western Blot bem como outras técnicas. Alternativamente, a classe e subclasse podem ser determinadas ao seqüenciar todo ou parte dos domínios constantes das cadeias pesada e/ou leve dos anticorpos, comparar sua seqüência de aminoácido com a
 5 seqüência de aminoácido conhecida de diversas classes e subclasses de imunoglobulinas, e determinar a classe e subclasse dos anticorpos.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-miostatina é um anticorpo monoclonal. O anticorpo anti-miostatina pode ser uma molécula IgG, IgM, IgE, IgA, ou IgD. Em uma modalidade preferida, o anticorpo anti-
 10 miostatina é uma IgG e é uma subclasse de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é subclasse de IgG2.

Identificação de Epitopos de Miostatina Reconhecidos por Anticorpos Anti-miostatina

A invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-miostatina
 15 humano que se liga à miostatina e concorre ou concorre reciprocamente com e/ou se liga ao mesmo epitopo que: (a) um anticorpo selecionado a partir de 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L211; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I;
 20 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; (b) um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada que possui a seqüência de aminoácido do domínio V_H em qualquer uma entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 ou 85, (c) um anticorpo que
 25 compreende um domínio variável de cadeia leve que possui a seqüência de aminoácido do domínio V_L em qualquer uma entre SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 ou 87 (d) um anticorpo que compreende tanto um domínio variável de cadeia pesada como definido em (b) como um domínio variável de cadeia leve como definido
 30 em (c).

Alguém pode determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epitopo ou concorre reciprocamente para a ligação com um anticorpo anti-

miostatina utilizando métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, alguém permite que o anticorpo anti-miostatina da invenção se ligue à miostatina sob condições de saturação e então mede a capacidade do anticorpo de teste se ligar à miostatina. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar à miostatina ao mesmo tempo que o anticorpo anti-miostatina de referência, então o anticorpo de teste se liga a um epitopo diferente do anticorpo anti-miostatina de referência. Entretanto, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar à miostatina ao mesmo tempo, então o anticorpo de teste se liga ao mesmo epitopo, um epitopo de superposição, ou um epitopo que está em estrita proximidade ao epitopo ligado pelo anticorpo anti-miostatina da invenção. Este experimento pode ser realizado utilizando ELISA, RIA, BIACORE®, ou citometria de fluxo. Para testar se um anticorpo anti-miostatina concorre reciprocamente com outro anticorpo anti-miostatina, alguém pode usar o método de concorrência descrito acima em duas direções, ou seja, determinar se o anticorpo conhecido bloqueia o anticorpo de teste e vice versa. Em uma modalidade preferida, o experimento é realizado utilizando ELISA.

Inibição de Atividade de Miostatina por Anticorpo Anti-miostatina

Alguém pode identificar os anticorpos monoclonais anti-miostatina que inibem a ligação de miostatina utilizando inúmeras análises. Por exemplo, os anticorpos anti-miostatina de neutralização podem ser identificados por sua capacidade de bloquear atividade de luciferase induzida por miostatina em células A204 transfectadas com um constructo de elementos/luciferase de resposta Smad como descrito no Exemplo III. Os anticorpos anti-miostatina preferidos possuem um IC_{50} de não mais que 500nM, 250nM, 100nM, 75nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 1nM, 0,5nM ou 0,1nM.

Alguém também pode determinar a capacidade de um anticorpo anti-miostatina de bloquear a ativação de proteína Smad induzida por miostatina ao contactar células de mioblasto de ratos L6 transfectadas com um constructo de beta lactamase/elemento de ligação-2/3 Smad com um anticorpo anti-miostatina como descrito no Exemplo IV. Em diversas modalidades, o anticorpo anti-miostatina possui um IC_{50} nesta análise de não mais que 500nM, 250nM, 100nM, 75nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 1nM,

0,5nM ou 0,1nM.

Alternativamente, os anticorpos anti-miostatina de neutralização podem ser identificados por sua capacidade de inibir a fosforilação de Smad 2 ou 3 em uma análise de Western Blot como descrito no Exemplo V.

5 Em outras modalidades, um anticorpo anti-miostatina da invenção modula a expressão de genes associados com a proliferação e diferenciação de célula muscular. Tal modulação inclui, porém sem caráter limitativo, reduzir a expressão da proteína P21 de inibidor de ciclo celular e proteína Bax pró-apoptótica, aumentar a fosforilação de Rb, e aumentar a expressão de Cdk2. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-miostatina antagonista da invenção aumentam a expressão de MyoD, miogenina e Myf5. O efeito de um anticorpo anti-miostatina sobre a expressão genética pode ser determinado utilizando inúmeras técnicas de rotina. (Vide, por exemplo, Exemplo VI).

15 Em algumas modalidades, um anticorpo anti-miostatina de neutralização da invenção aumenta a diferenciação de mioblasto. A capacidade de um anticorpo aumentar tal proliferação e diferenciação pode ser determinada por análises que utilizam, por exemplo, células C2C12 como descrito no Exemplo VII.

20 Anticorpos Anti-miostatina Humanos Competitivos vs Não-competitivos

Os anticorpos anti-miostatina humanos da invenção podem ser categorizados como competitivos e não-competitivos com outras proteínas de ligação de miostatina inibidoras que utilizam experimentos de imunoprecipitação. Por exemplo, o pró-peptídeo, que forma um complexo com GDF8 maduro, é uma proteína inibidora. O meio condicionado de células 293T que expressam GDF8 contém GDF8 maduro, GDF8 maduro/complexo de pró-peptídeo e GDF8 não-processado. Os estudos de imunoprecipitação foram realizados para testar a ligação dos anticorpos anti-miostatina humanos na invenção a GDF8 maduro/complexo de pró-peptídeo utilizando este meio condicionado. Como descrito no Exemplo X, os anticorpos 2_112_1, 2_43_1 e 2_177_1 ligaram e imunoprecipitaram GDF8 maduro, GDF8 maduro/complexo de pró-peptídeo, e GDF8 não-processado. O anticorpo 1_66_1

ligou e imunoprecipitou GDF8 maduro e GDF8 maduro/complexo de pró-peptídeo. Nenhum destes anticorpos imunoprecipitou GDF8 maduro, pró-peptídeo, ou GDF8 não-processado. Os anticorpos 2_112_1, 2_43_1 e 2_177_1, desta maneira, são anticorpos não-competitivos, e anticorpo 5 1_66_1 também é um anticorpo não-competitivo, porém um que se liga a um epítipo diferente de miostatina. Um anticorpo de neutralização não-competitivo, isto é, um que se liga à miostatina na presença de outras proteínas inibidoras, terá melhor eficácia in vivo do que um anticorpo competitivo.

Em outras modalidades, um anticorpo anti-miostatina da inven-
10 ção imunoprecipita GDF8 maduro a partir de soro de camundongo. Como descrito no Exemplo XI, os anticorpos monoclonais 2_112, 2_43_1 e 2_ ob-
têm mais GDF8 madura do que 1_116_1 e 1_66_1.

Especificidade de Espécie e Seletividade Molecular

Em outro aspecto da invenção, os anticorpos anti-miostatina
15 demonstram tanto especificidade de espécie como seletividade molecular. Em outras modalidades, o anticorpo anti-miostatina se liga a miostatina em seres humanos, camundongo, *Rattus norvegicus* (rato Norway), *cynomolgus* macaque (macaco), *Macaca fascicularis* (macaco caranguejeiro), *Meleagris gallopavo* (peru), *Sus scrofa* (porco), *Gallus gallus* (galo), *Gallus gallus* (ga-
20 lo), *Canis familiaris* (cão), *Equus caballus* (cavalo), *Coturnix chinensis* (co-
dorna), *Coturnix coturnix* (codorna comum), e *Columba livia* (pombo co-
mum). Após as instruções do relatório descritivo, alguém pode determinar a especificidade de espécie do anticorpo anti-miostatina utilizando métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, alguém pode determinar a especi-
25 ficidade de espécie utilizando análise de Western blot, ressonância de plásmen de superfície, por exemplo, BIAcore, ELISA, imunoprecipitação ou RIA.

Em outras modalidades, o anticorpo anti-miostatina possui uma seletividade de miostatina sobre GDF11 de pelo menos 50 dobras ou pelo
30 menos 100 dobras. GDF11 é um elemento de família próxima de miostatina que compartilha noventa por cento de identidade em sua proteína madura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-miostatina não exibe nenhuma

ligação específica notável a nenhuma outra proteína que não miostatina. Alguém pode determinar a seletividade do anticorpo anti-miostatina de miostatina utilizando métodos bem-conhecidos na técnica seguindo as instruções do relatório descritivo. Por exemplo, alguém pode determinar a seletividade utilizando análise de Western blot, citometria de fluxo, ELISA, imunoprecipitação ou RIA.

Em outras modalidades da invenção, o anticorpo anti-miostatina não possui este alto grau de seletividade para GDF8 sobre GDF11.

Métodos para Produzir Anticorpos e Linhas Celulares Produtoras de Anticorpo

Imunização

Em algumas modalidades, os anticorpos humanos são produzidos ao imunizar um animal não-humano, transgênico que compreende dentro de seu genoma algum ou todos os locos de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina humana com um antígeno de miostatina. Em uma modalidade preferida, o animal não-humano é um animal XENOMOUSE® (Abgenix, Inc., Fremont, CA).

Os camundongos XENOMOUSE® são cepas de camundongos engenheirados que compreendem grandes fragmentos de locos de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina humana e são deficientes em produção de anticorpo de camundongo. Vide, por exemplo, Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) e Patentes U.S. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 e 6.150.584. Vide também, WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, e WO 00/037504.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para fabricar anticorpos anti-miostatina de animais não-humanos, não-camundongos ao imunizar animais transgênicos não-humanos que compreendem locos de imunoglobulina humana com um antígeno de miostatina. Alguém pode produzir tais animais utilizando os métodos descritos nos documentos citados acima. Os métodos descritos nestes documentos podem

ser modificados como descrito na Patente U.S. 5.994.619, que está incorporada por meio deste à guisa de referência. A Patente U.S. 5.994.619 descreve métodos para produzir novas linhas celulares e células de massa de célula interna (CICM) cultivadas, derivadas de porcos e vacas, e células de CICM transgênicas dentro das quais o DNA heterólogo foi inserido. As células de CICM transgênicas podem ser usadas para produzir embriões, fetos e produtos transgênicos clonados. A patente '619 também descreve métodos para produzir animais transgênicos que são capazes de transmitir o DNA heterólogo para sua progênie. Em modalidades preferidas da presente invenção, os animais não-humanos são mamíferos, particularmente, ratos, carneiro, porcos, cabras, gados, cavalos ou galinhas.

Os camundongos XENOMOUSE[®] produzem um repertório humano tipo adulto de anticorpos completamente humanos e geram anticorpos humanos específicos de antígeno. Em algumas modalidades, os camundongos XENOMOUSE[®] contêm aproximadamente 80% do repertório de gene V de anticorpo humano através da introdução de fragmentos de configuração de linhagem germinativa dimensionada em megabase dos locos de cadeia pesada humana e locos de cadeia leve kappa em cromossomo artificial de levedura (YAC). Em outras modalidades, os camundongos XENOMOUSE[®] contêm de forma adicional aproximadamente todo o loco de cadeia leve lambda. Vide, Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), e WO 98/24893, cujas descrições estão incorporadas por meio deste a guisa de referência.

Em algumas modalidades, o animal não-humano que compreende genes de imunoglobulina humana são animais que possuem um "mini-loco". Na abordagem de minilocos, um loco Ig exógeno é imitado através da inclusão de genes individuais do loco Ig. Desta maneira, um ou mais genes V_H, um ou mais genes D_H, um ou mais genes J_H, um domínio constante e um segundo domínio constante (de preferência, um domínio constante gamma) são formados dentro de um constructo para a inserção dentro de um animal. Esta abordagem é descrita, *inter alia*, nas Patentes Nos. U.S. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429,

5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, e 5.643.763, incorporadas aqui a guisa de referência.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para fabricar anticorpos anti-miostatina humanizados. Em algumas modalidades, os animais não-humanos são imunizados com um antígeno de miostatina como descrito abaixo sob condições que permitem a produção de anticorpo. As células produtoras de anticorpo são isoladas dos animais, e os ácidos nucleicos que codificam as cadeias pesada e leve de um anticorpo anti-miostatina de interesse são isolados das células produtoras de anticorpo isoladas ou de uma linha celular imortalizada produzida a partir de tais células. Estes ácidos nucleicos são subsequenteemente engenheirados utilizando técnicas conhecidas pelo versado na técnica e como descrito adicionalmente abaixo para reduzir a quantidade de sequência não-humana, ou seja, para humanizar o anticorpo para reduzir a resposta imune em seres humanos.

Em algumas modalidades, o antígeno miostatina é miostatina isolada e/ou purificada. Em algumas modalidades, o antígeno de miostatina é miostatina humana. Entretanto, devido ao fato de a miostatina madura de C-terminal de seres humanos, camundongos, rato, cão, codorna, galinha, peru, porco, cavalo e macacos ser idêntica e não ser glicosilada em células, a miostatina destas espécies e outras espécies que possuem a mesma sequência de proteína madura também pode ser usada como imunógeno. Em outras modalidades, o antígeno de miostatina é uma célula que expressa ou superexpressa miostatina. Em outras modalidades, o antígeno de miostatina é uma proteína recombinante expressa a partir de levedura, células de insetos, bactérias como E.Coli, ou outros recursos por tecnologia recombinante.

A imunização de animais pode ser feita através de qualquer método conhecido na técnica. Vide, por exemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Os métodos para imunizar animais não-humanos tais como camundongos, ratos, carneiro, cabras, porcos, gado e cavalos são bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Harlow and Lane, supra, e Patente U.S. 5.994.619. Em uma modalidade preferida, o antígeno de miostatina é administrado com um

adjuvante para estimular a resposta imune. Os adjuvantes exemplificativos incluem adjuvante de Freund completo ou incompleto, RIBI (dipeptídeos de muramil) ou ISCOM (complexos imunoestimulantes). Tais adjuvantes podem proteger o polipeptídeo de dispersão rápida por seqüestro do mesmo em um depósito local, ou estes podem conter substâncias que estimulam o hospedeiro a secretar fatores que são quimiotáticos de macrófagos e outros componentes do sistema imune. De preferência, se um polipeptídeo estiver sendo administrado, o programa de imunização irá envolver duas ou mais administrações do polipeptídeo, distribuídas durante diversas semanas. O Exemplo I exemplifica um método para produzir anticorpos monoclonais anti-miostatina em camundongos XenoMouse®.

Produção de Anticorpos e Linhas Celulares Produtoras de Anticorpo

Após a imunização de um animal com um antígeno de miostatina, os anticorpos e/ou células produtoras de anticorpo podem ser obtidos a partir do animal. Em algumas modalidades, o soro dotado de anticorpo anti-miostatina é obtido do animal por sangramento ou sacrificando o animal. O soro pode ser usado, visto que este é obtido do animal, uma fração de imunoglobulina pode ser obtida do soro, ou os anticorpos anti-miostatina podem ser purificados a partir do soro.

Em algumas modalidades, as linhas celulares produtoras de anticorpo são preparadas a partir de células isoladas do animal imunizado. Após a imunização, o animal é sacrificado e o linfonodo e/ou células B esplênicas são imortalizadas através de qualquer meio conhecido na técnica. Os métodos para imortalizar células incluem, porém sem caráter limitativo, transfectá-las com oncogenes, infectá-las com um vírus oncogênico e cultivá-las sob condições que selecionam células imortalizadas, submetê-las a compostos carcinogênicos ou mutantes, fundi-las com uma célula imortalizada, por exemplo, uma célula do mieloma, e ao inativar um gene supressor de tumor. Vide, por exemplo, Harlow and Lane, supra. Se a fusão com células do mieloma for usada, as células do mieloma, de preferência, não secretam polipeptídeos de imunoglobulina (uma linha celular não-secretora). As células imortalizadas são examinadas utilizando miostatina, ou uma parte da

mesma. Em uma modalidade preferida, a triagem inicial é realizada utilizando um imunoenensaio ligado à enzima (ELISA) ou um radioimunoenensaio. Um exemplo de triagem ELISA é proporcionado em WO 00/37504, incorporado aqui a guisa de referência.

- 5 As células produtoras de anticorpo anti-miostatina, por exemplo, hibridomas, são selecionadas, clonadas e adicionalmente examinadas por características desejadas, inclusive, crescimento robusto, alta produção de anticorpo e características de anticorpo desejadas, como discutido adicionalmente abaixo. Os hibridomas podem ser expandidos *in vivo* em animais
- 10 singênicos, em animais que carecem de um sistema imune, por exemplo, camundongos nus, ou em cultura celular *in vitro*. Os métodos de seleção, clonagem e expansão de hibridomas são bem-conhecidos pelos versados na técnica.

- Em uma modalidade preferida, o animal imunizado é um animal
- 15 não-humano que expressa genes de imunoglobulina humana e as células B esplênicas são fundidas com uma linha celular de mieloma da mesma espécie que o animal não-humano. Em uma modalidade mais preferida, o animal imunizado é um camundongo XENOMOUSE® e a linha celular do mieloma é um mieloma de camundongo não-secretor. Em uma modalidade ainda mais
- 20 preferida, a linha celular de mieloma é P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Vide, por exemplo, Exemplo I.

- Desta maneira, em uma modalidade, a invenção proporciona métodos para produzir uma linha celular que produz um anticorpo monoclonal humano ou um fragmento deste direcionado a miostatina que compreende
- 25 (a) imunizar um animal transgênico não-humano descrito aqui com miostatina, uma parte de miostatina ou uma célula ou tecido que expressa miostatina; (b) permitir que o animal transgênico estabeleça uma resposta imune à miostatina; (c) isolar as células produtoras de anticorpo do animal transgênico; (d) imortalizar as células produtoras de anticorpo; (e) criar populações
- 30 monoclonais individuais das células produtoras de anticorpo imortalizadas; e (f) examinar as células produtoras de anticorpo imortalizadas para identificar um anticorpo direcionado a miostatina.

Em outro aspecto, a invenção proporciona uma linha celular que produz um anticorpo anti-miostatina humano. Em algumas modalidades, a linha celular é uma linha celular de hibridoma. Em algumas modalidades, os hibridomas são hibridomas de camundongo, como descrito acima. Em outras
5 modalidades, os hibridomas são produzidos em uma espécie não-humana, não-camundongo tal como ratos, carneiro, porcos, cabras, gado ou cavalos. Em outra modalidade, os hibridomas são hibridomas humanos.

Em outra modalidade, um animal transgênico é imunizado com um antígeno de miostatina, as células primárias, por exemplo, células B do
10 baço ou sangue periférico, são isoladas de um animal transgênico imunizado e as células individuais, que produzem anticorpos específicos para o antígeno desejado, são identificadas. O mRNA poliadenilado de cada célula individual é isolado a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) é realizada utilizando iniciadores senso que se anelam em se-
15 quências de domínio variável, por exemplo, degeneram iniciadores que reconhecem a maioria ou todas as regiões FR1 de genes humanos de domínio variável de cadeia leve e pesada e iniciadores anti-senso que se anelam em sequências de região constante ou de união. Os cDNAs dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada são então clonados e expressos em qualquer
20 célula hospedeira adequada, por exemplo, uma célula do mieloma, como anticorpos quiméricos com respectivas regiões constantes de imunoglobulina, tais como a cadeia pesada e domínios constantes κ ou λ . Vide, Babcook, J.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48, 1996, incorporado aqui à guisa de referência. Os anticorpos anti miostatina podem ser então identifi-
25 cados e isolados como descrito aqui.

Em outra modalidade, as técnicas de expositores de fago podem ser usadas para proporcionar bibliotecas que contêm um repertório de anticorpos com afinidades variadas com miostatina. Para produção de tal repertório, não é necessário imortalizar as células B do animal imunizado. De preferência, as células B primárias podem ser usadas diretamente como uma
30 fonte de mRNA. A mistura de cDNAs obtida das células B, por exemplo, derivadas de baços, é usada para preparar uma biblioteca de expressão, por

- exemplo, uma biblioteca de expositores de fago transfectada em *E.coli*. As células resultantes são testadas para imunorreatividade a miostatina. As técnicas para a identificação de anticorpos humanos de alta afinidade de tais bibliotecas são descritas por Griffiths et al., *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994);
- 5 Nissim et al., *ibid*, pp. 692 a 698 e por Griffiths et al., *ibid*, 12:725 a 734, que estão incorporados aqui à guisa de referência. Finalmente, os clones da biblioteca que são identificados produzem afinidades de ligação de uma magnitude desejada ao antígeno e o DNA que codifica o produto responsável por tal ligação é recuperado e manipulado para expressão recombinante padrão.
- 10 As bibliotecas de expositores de fago também podem ser construídas utilizando seqüências de nucleotídeo anteriormente manipuladas e examinadas de maneira similar. Em geral, os cDNAs que codificam cadeias pesadas e leves são independentemente fornecidos ou ligados para formar análogos de Fv para a produção na biblioteca de fago.
- 15 A biblioteca de fago é então examinada para os anticorpos com as afinidades mais altas com miostatina e o material genético recuperado do clone apropriado. Séries adicionais de triagem podem aumentar a afinidade do anticorpo original isolado.

20 Ácidos Nucléicos, Vetores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes para Fabricar Anticorpos

Ácidos Nucléicos

- A presente invenção também inclui moléculas de ácido nucléico que codificam anticorpos anti-miostatina ou fragmentos de ligação de antígeno destes. Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucléico diferentes codificam uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina
- 25 anti-miostatina. Em outras modalidades, a mesma molécula de ácido nucléico codifica uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina anti-miostatina.

- Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico que codifica o domínio variável da cadeia leve (V_L) utiliza um gene humano V_k A3, A30 ou L2, e um gene humano J_k1 , J_k3 ou J_k4 . Em algumas modalidades, a
- 30 molécula de ácido nucléico utiliza um gene humano V_k A30, A3 ou L2 e um

gene humano Jk4. Em outras modalidades, a molécula de ácido nucléico utiliza um gene humano A30, A3 ou L2 e um gene humano Jk1. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico que codifica a cadeia leve codifica uma seqüência de aminoácido que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições da(s) seqüência(s) de aminoácido de linhagem germinativa. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de aminoácido V_L que compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácido conservativas e/ou 1, 2, ou 3 substituições não-conservativas comparadas com seqüências V_K e J_K de linhagem germinativa. As substituições podem estar nas regiões CDR, nas regiões de moldura ou no domínio constante.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica uma seqüência de aminoácido V_L que compreende uma ou mais mutações comparadas com a seqüência de linhagem germinativa que são idênticas às mutações de linhagem germinativa encontradas na V_L de qualquer um entre os anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica pelo menos três substituições de aminoácido comparadas com a seqüência de linhagem germinativa encontrada na V_L de qualquer um entre os anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido V_L de anticorpo monoclonal 1_116_1 (SEQ ID NO: 4); 1_136_3 (SEQ ID NO: 12); 1_257_1 (SEQ ID NO: 16); 1_46_1 (SEQ ID NO: 24); 2_112_1

(SEQ ID NO: 28); 1_314_1 (SEQ ID NO: 20--__); 1_66_1 (SEQ ID NO: 36); 2_43_1 (SEQ ID NO: 28); 2_177_1 (SEQ ID NO: 40); 1_132_1 (SEQ ID NO: 8); ou 1_268_1 (SEQ ID NO: 32) ou uma variante ou parte desta. Em algumas modalidades, o ácido nucléico codifica uma seqüência de aminoácido que compreende CDRs de cadeia leve de um dos ditos anticorpos listados acima. Em algumas modalidades, a dita parte é uma parte contígua que compreende CDR1 a CDR3.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido de uma entre SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 ou 87. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 48, 52, 56, 60, 68, 72, 80, 64, 76, 84 ou 88 ou uma parte desta. Em algumas modalidades, o ácido nucléico codifica a seqüência de aminoácido da cadeia leve de uma, duas ou todas três CDRs de dito anticorpo. Em algumas modalidades, a dita parte codifica uma região contígua de CDR1 a CDR3 da cadeia leve de um anticorpo anti-miostatina.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica uma seqüência de aminoácido V_L que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica à seqüência de aminoácido V_L de qualquer um entre os anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V, ou à seqüência de aminoácido da região V_L de qualquer uma entre SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 ou 87. As moléculas de ácido nucléico da invenção incluem ácidos nucléicos que se hibridizam sob condições altamente estridentes, tais como aqueles descritos acima, ou que são pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntico a um ácido nucléico que codifica a seqüência de

aminoácido de região V_L de SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 ou 87 ou a um ácido nucléico que compreende a sequência de nucleotídeo de região V_L de SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 48, 52, 56, 60, 68, 72, 80, 64, 76, 84 ou 88.

5 Em outras modalidades preferidas, a molécula de ácido nucléico codifica o domínio variável de uma cadeia pesada (V_H) que utiliza uma sequência de gene humano V_H 1-02, 3-21 ou 3-23 ou uma sequência derivada desta. Em diversas modalidades, a molécula de ácido nucléico utilize um gene humano V_H 1-02, um gene D4-23 e um gene humano J_H 6b; um gene
10 humano V_H 3-21, um gene humano D3-16 ou D5-12 e um gene humano J_H 6b; um gene humano V_H 3-21, um gene humano D1-26 ou D5-5 e um gene humano J_H 4b; um gene humano V_H 3-23, um gene humano D1-7 e um gene humano J_H 3b.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica
15 uma sequência de aminoácido que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 mutações comparadas com a sequência de aminoácido de linhagem germinativa dos genes humanos V, D ou J. Em algumas modalidades, as ditas mutações estão na região V_H . Em algumas modalidades, as ditas mutações estão nas regiões de CDR.

20 Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica uma sequência V_H que compreende uma ou mais mutações de aminoácido comparadas com a sequência V_H de linhagem germinativa que são idênticas às mutações de aminoácido encontradas na V_H de anticorpo monoclonal 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1,
25 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. Em algumas modalidades, o ácido nucléico codifica pelo menos três mutações de aminoácido comparadas com as sequências de linhagem
30 germinativa que são idênticas a pelo menos três mutações de aminoácido encontradas em um dos anticorpos listados acima.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico com-

preende uma seqüência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma parte da seqüência de aminoácido V_H de um anticorpo monoclonal selecionado entre 1_116_1 (SEQ ID NO: 2); 1_136_3 (SEQ ID NO: 10); 1_257_1 (SEQ ID NO: 14); 1_46_1 (SEQ ID NO: 22); 2_112_1 (SEQ ID NO: 26); 1_314_1 (SEQ ID NO: 18); 1_66_1 (SEQ ID NO: 34); 2_43_1 (SEQ ID NO: 42); 2_177_1 (SEQ ID NO: 38); 1_132_1 (SEQ ID NO: 6); ou 1_268_1 (SEQ ID NO: 30), uma variante deste, ou dita seqüência que possui mutações de aminoácido conservativas e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não-conservativas. Em diversas modalidades, a seqüência codifica uma ou mais regiões de CDR, de preferência, uma região CDR3, todas três regiões de CDR, uma parte contígua que inclui CDR1 a CDR3, ou toda a região V_H, de um anticorpo anti-miostatina listado acima.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido de uma entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 ou 85. Em diversas modalidades preferidas, a molécula de ácido nucléico compreende pelo menos uma parte da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82 ou 86. Em algumas modalidades, a dita parte codifica a região V_H, uma região CDR3, todas três regiões de CDR ou uma região contígua que inclui CDR1 a CDR3.

Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucléico codifica uma seqüência de aminoácido V_H que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica à seqüência de aminoácido V_H em qualquer uma entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81 ou 85. As moléculas de ácido nucléico da invenção incluem ácidos nucléicos que se hibridizam sob condições altamente estridentes, tais como aqueles descritos acima, ou que são pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticos a um ácido nucléico que codifica a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 ou 42 ou a uma região V_H desta, ou a um ácido nucléico que compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NOS: 1, 5,

9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 ou 41 ou a seqüência de nucleotídeo que codifica uma região V_H desta.

Em outra modalidade, o ácido nucléico codifica uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo selecionado a partir de 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V, ou uma cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 ou 42. Ademais, o ácido nucléico pode compreender a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 ou 41.

Uma molécula de ácido nucléico que codifica a cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-miostatina ou partes deste pode ser isolada de qualquer fonte que produz tal anticorpo. Em diversas modalidades, as moléculas de ácido nucléico são isoladas de uma célula B que expressa um anticorpo anti-miostatina isolado de um animal imunizado com miostatina ou de uma célula imortalizada derivada de tal célula B. Os métodos para isolar ácidos nucléicos que codificam um anticorpo são bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Sambrook et al. O mRNA pode ser isolado e usado para produzir cDNA para uso na reação em cadeia da polimerase (PCR) ou clonagem de cDNA de genes de anticorpo. Em uma modalidade preferida, a molécula de ácido nucléico é isolada de um hibridoma que possui como um de seus associados de fusão, uma célula de um animal transgênico não-humano, sendo que a dita célula produz uma imunoglobulina humana. Em uma modalidade ainda mais preferida, a célula que produz imunoglobulina humana é isolada de um animal XENOMOUSE®. Em outra modalidade, a célula que produz a imunoglobulina humana é isolada de um animal transgênico não-humano, não-camundongo, como descrito acima. Em outra modalidade, o ácido nucléico é isolado de um animal não-transgênico não-humano. As moléculas de ácido nucléico isoladas de um animal não-transgênico não-humano, podem ser usadas, por exemplo, por anticorpos

humanizados que compreendem uma ou mais seqüências de aminoácido de um anticorpo anti-miostatina humano da presente invenção.

Em algumas modalidades, um ácido nucléico que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti-miostatina da invenção pode compreender uma seqüência de nucleotídeo que codifica um domínio V_H da invenção
5 unido em moldura a uma seqüência de nucleotídeo que codifica um domínio constante de cadeia pesada de qualquer fonte. De forma similar, uma molécula de ácido nucléico que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti-miostatina da invenção pode compreender uma seqüência de nucleotídeo
10 que codifica um domínio V_L da invenção unido em moldura a uma seqüência de nucleotídeo que codifica um domínio constante de cadeia leve de qualquer fonte.

Em um aspecto adicional da invenção, as moléculas de ácido nucléico que codificam o domínio variável das cadeias pesadas (V_H) e/ou
15 leves (V_L) são "convertidas" em genes de anticorpo de comprimento total. Em uma modalidade, as moléculas de ácido nucléico que codificam os domínios V_H ou V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total mediante inserção dentro de um vetor de expressão que já está codificando os domínios constantes de cadeia pesada (C_H) ou constantes de cadeia leve (C_L), respectivamente, de modo que o segmento V_H seja ligado de
20 forma operável ao(s) segmento(s) C_H dentro do vetor, e/ou de modo que o segmento V_L seja ligado de operável ao segmento C_L dentro do vetor. Em outra modalidade, as moléculas de ácido nucléico que codificam os domínios V_H e/ou V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total mediante ligação, por exemplo, ligar uma molécula de ácido nucléico que codifica os domínios V_H e/ou V_L a uma molécula de ácido nucléico que codifica um domínio C_H e/ou C_L que utiliza técnicas biológicas moleculares padrão.
25 As seqüências de ácido nucléico de genes humanos de domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada e leve são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,
30 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. As moléculas de ácido nucléico que codificam as cadeias pesadas e/ou leves de comprimento total podem ser

então expressas a partir de uma célula dentro da qual estas foram introduzidas e o anticorpo anti-miostatina isolado.

As moléculas de ácido nucléico podem ser usadas para expressar de forma recombinante grandes quantidades de anticorpos anti-miostatina. As moléculas de ácido nucléico também podem ser usadas para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos de cadeia única, imunoadesinas, anticorpos bivalentes, anticorpos modificados e derivados de anticorpo, como descrito adicionalmente abaixo. Se as moléculas de ácido nucléico forem derivadas de um animal não-transgênico não humano, as moléculas de ácido nucléico podem ser usadas para humanização de anticorpo, também como descrito abaixo.

Em outra modalidade, uma molécula de ácido da invenção é usada como uma sonda ou iniciador de PCR para uma sequência de anticorpo específica. Por exemplo, o ácido nucléico pode ser usado como uma sonda em métodos diagnósticos ou como um iniciador de PCR para amplificar as regiões de DNA que poderiam ser usadas, inter alia, para isolar moléculas de ácido nucléico adicionais que codificam domínios variáveis de anticorpos anti-miostatina. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucléico são oligonucleotídeos. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos são de domínios altamente variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo de interesse. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos codificam todas ou parte de uma ou mais CDRs de anticorpos 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; ou 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V ou variantes destes como descrito aqui.

Vetores

A invenção proporciona vetores que compreendem moléculas de ácido nucléico que codificam a cadeia pesada de um anticorpo anti-miostatina da invenção ou uma parte de ligação de antígeno deste. A invenção também proporciona vetores que compreendem moléculas de ácido nu-

cléico que codificam a cadeia leve de tais anticorpos ou parte de ligação de antígeno deste. A invenção proporciona adicionalmente vetores que compreende moléculas de ácido nucléico que codificam proteínas de fusão, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpo, e sondas destes.

5 Em algumas modalidades, os anticorpos anti-miostatina da invenção ou parte de ligação de antígeno são expressos ao inserir DNAs que codificam cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou total, obtidos como descrito acima, dentro de vetores de expressão de modo que os genes sejam ligados de forma operável a seqüências de controle de expressão ne-

10 cessárias tais como seqüências de controle transcricional e translacional. Os vetores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, adenovírus, vírus ade-

15 no-associado (AAV), vírus de planta tais como vírus do mosaico de couve-flor, vírus do mosaico do tabaco, cosmídios, YACs, epissomas derivados de EBV, e similares. O gene de anticorpo está ligado dentro de um vetor de

20 modo que as seqüências de controle transcricional e translacional dentro do vetor cumpram sua função programada de regular a transcrição e tradução do gene de anticorpo. O vetor de expressão e seqüências de controle de expressão são selecionados para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de ca-

25 deia pesada de anticorpo podem ser inseridos dentro de vetores separados. Em uma modalidade preferida, ambos os genes são inseridos dentro do mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos dentro do vetor de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares sobre o fragmento de gene de anticorpo e vetor,

 ou ligação de extremidade cega, se nenhum sítio de restrição estiver presente).

 Um vetor conveniente é um que codifica uma seqüência de imunoglobulina C_H ou C_L humana funcionalmente completa, com sítios de restrição apropriados engenheirados de modo que qualquer seqüência V_H ou V_L

30 possa ser facilmente inserida e expressão, como descrito acima. Em tais vetores, geralmente ocorre junção entre o sítio doador de junção na região J inserida e o sítio acceptor de junção que antecede o domínio humano C, e

também em regiões de junção que ocorrem dentro dos exons humanos C_H. A poliadenilação e o término da transcrição ocorrem em sítios cromossomais nativos a jusante das regiões de codificação. O vetor de expressão recombinante também pode codificar um peptídeo de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado dentro do vetor de modo que o peptídeo de sinal seja ligado em moldura à terminação amino da cadeia de imunoglobulina. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína de não-imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção conduzem seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. Será avaliado pelo versado na técnica que o desenho do vetor de expressão, inclusive a seleção de seqüências reguladoras pode depender de tais fatores como a seleção da célula hospedeira que será transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. As seqüências reguladoras preferidas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direcionam altos níveis de expressão de proteína em células de mamíferos, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/intensificador de CMV), Vírus Simian 40 (SV40) (tal como o promotor/intensificador de SV40), adenovírus, (por exemplo, o promotor principal tardio de adenovírus (AdMLP)), políoma e fortes promotores de mamífero tais como promotores de imunoglobulina e actina nativos. Para descrição adicional de elementos reguladores virais, e seqüências destes, vide, por exemplo, Patente No. U.S. 5.168.062, Patente No. U.S. 4.510.245 e Patente No. U.S. 4.968.615. Os métodos para expressar anticorpos em plantas, inclusive uma descrição de promotores e vetores, bem como, transformação de plantas são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente norte-americana 6.517.529, incorporada aqui à guisa de referência. Os métodos para expressar polipeptídeos em células bacterianas ou células fungosas, por exemplo, células de levedu-

ra, também são bem-conhecidos na técnica.

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem conduzir seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do
 5 vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras dentro das quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Patente Nos. U.S. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, incorporadas aqui à guisa de referência). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, sobre uma célula hospedeira dentro da qual o vetor foi introduzido. Os genes marcadores selecionáveis preferidos incluem gene de diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato), o gene neo (para seleção de G418), e o
 10 gene glutamato sintetase.

Células Hospedeiras de Não-Híbrido e Métodos para Produzir Proteína de forma Recombinante

As moléculas de ácido nucléico que codificam anticorpos anti-miostatina e vetores que compreendem estas moléculas de ácido nucléico
 20 podem ser usadas para transfecção de uma célula hospedeira de mamífero, planta, bactéria ou levedura adequada. A transformação pode ser realizada através de qualquer método para introduzir polinucleotídeos dentro de uma célula hospedeira. Os métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos dentro de células de mamíferos são bem-conhecidos na técnica e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio,
 25 transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulação do(s) polinucleotídeo(s) em lipossomas, e microinjeção direta do DNA dentro dos núcleos. Ademais, as moléculas de ácido nucléico podem ser introduzidas dentro de células de mamífero por vetores virais. Os métodos para transformar células são bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente Nos. U.S. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, e 4.959.455, incorporadas aqui à guisa de referência). Os métodos para transformar célu-

las de plantas são bem-conhecidos na técnica, inclusive, por exemplo, transformação mediada por agrobactéria, transformação biolística, injeção direta, eletroporação e transformação viral. Os métodos para transformar células de bactérias e de levedura também são bem-conhecidos na técnica.

5 As linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiras para expressão são bem-conhecidas na técnica e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis a partir de American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluem, *inter alia*, células de ovário de hamster chinês (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de rim de hamster recém-nascido (BHK), células de rim de macaco verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humanas (por exemplo, Hep G2), células A549, e inúmeras outras linhas celulares. As linhas celulares de preferência particular são selecionadas através da determinação de quais linhas celulares possuem altos níveis de expressão.

15 As linhas celulares que não aquelas de origem mamífera também podem ser usadas. Estas incluem linhas celulares de insetos (tais como células Sf9 ou Sf21), células de plantas (inclusive aquelas de *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *nadabau*, milho, trigo, batata, etc.), células de bactérias (inclusive *E. coli* e *Streptomyces*) e células de levedura (inclusive *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*).

20 Quando os vetores de expressão recombinante que codificam genes de anticorpo forem introduzidas dentro de células hospedeiras, os anticorpos são produzidos ao cultivar as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo dentro do meio de cultura onde as células hospedeiras estão se desenvolvendo. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando métodos de purificação de proteína padrão.

25 Quando os vetores de expressão recombinante que codificam genes de anticorpo forem introduzidas dentro de células hospedeiras, os anticorpos são produzidos ao cultivar as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo dentro do meio de cultura onde as células hospedeiras estão se desenvolvendo. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando métodos de purificação de proteína padrão.

30 A expressão de anticorpos da invenção de linhas celulares de produção pode ser aumentada utilizando inúmeras técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão de gene glutamina sintetase (o sistema GS) é uma abordagem comum para aumentar a expressão sob certas con-

dições. O sistema GS é discutido em sua totalidade ou parte em conjunto com a Patente européia Nos. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 e 0 338 841.

É provável que os anticorpos expressos por linhas celulares diferentes ou em animais transgênicos irão possuir glicosilação diferente um do outro. Entretanto, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácido nucléico proporcionadas aqui, ou que compreendem a seqüência de amino-ácido proporcionada aqui são parte da presente invenção, independente da glicosilação dos anticorpos.

Animais e Plantas Transgênicas

Os anticorpos anti-miostatina da invenção também podem ser produzidos de forma transgênica através da geração de um mamífero ou planta que é transgênico para as seqüências de cadeia pesada e leve de imunoglobulina de interesse e produção do anticorpo em uma forma recuperável destas. Em conjunto com a produção transgênica em mamíferos, os anticorpos anti-miostatina podem ser produzidos em, e recuperados de, leite de cabras, vacas, ou outros mamíferos. Vide, por exemplo, Patente Nos. U.S. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, e 5.741.957, incorporadas aqui à guisa de referência. Em algumas modalidades, os animais transgênicos não-humanos que compreendem locos de imunoglobulina humana são imunizados com miostatina ou uma parte imunogênica desta, como descrito acima. Os métodos para fabricar anticorpos em plantas são descritos, por exemplo, nas patentes U.S. 6.046.037 e 5.959.177, incorporadas aqui à guisa de referência.

Em algumas modalidades, os animais transgênicos não-humanos ou plantas são produzidos ao introduzir uma ou mais moléculas de ácido nucléico que codificam um anticorpo anti-miostatina da invenção dentro do animal ou planta através de técnicas transgênicas padrão. Vide, Hogan e Patente norte-americana 6.417.429, *supra*. As células transgênicas usadas para formar o animal transgênico podem ser células-tronco embrionárias ou células somáticas ou um ovo fertilizado. Os organismos não-humanos transgênicos podem ser quiméricos, heterozigotos não-quiméricos, e homozigotos não-quiméricos. Vide, por exemplo, Hogan et al., Manipulat-

ing the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); e Pinkert, Animal transgênico Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), todas incorporadas aqui à guisa de referência. Em algumas modalidades, os animais transgênicos não-humanos possuem uma interrupção e substituição marcados por um constructo de marcação que codifica uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve de interesse. Em uma modalidade preferida, os animais transgênicos compreendem e expressam moléculas de ácido nucléico que codificam cadeias pesadas e leves que se ligam especificamente à miostatina, de preferência, miostatina humana. Em algumas modalidades, os animais transgênicos compreendem moléculas de ácido nucléico que codificam um anticorpo modificado tal como um anticorpo de cadeia única, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Os anticorpos anti-miostatina podem ser feitos em qualquer animal transgênico. Em uma modalidade preferida, os animais não-humanos são camundongos, ratos, carneiro, porcos, cabras, gado ou cavalos. O animal transgênico não-humano expressa os ditos polipeptídeos codificados em sangue, leite, urina, saliva, lágrimas, muco e outros fluidos corpóreos.

20 Bibliotecas Expositores de fago

A invenção proporciona um método para produzir um anticorpo anti-miostatina ou parte de ligação de antígeno deste que compreende as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos sobre fago, examinar a biblioteca com miostatina ou uma parte de ligação de anticorpo desta, isolar o fago que se liga a miostatina, e obter o anticorpo do fago. À guisa de exemplo, um método para preparar a biblioteca de anticorpos para uso em técnicas de expositores de fago compreende as etapas de imunizar um animal não-humano que compreende locos de imunoglobulina humana com miostatina ou uma parte antigênica destes para criar uma resposta imune, extrair as células produtoras de anticorpo do animal imunizado; isolar o RNA que codifica cadeias pesadas e leves de anticorpos da invenção das células extraídas, transcrever de forma reversa o RNA para produzir cDNA, amplifi-

car o cDNA que utiliza iniciadores, e inserir o cDNA dentro de um vetor expositores de fago de modo que os anticorpos sejam expressos sobre o fago. Os anticorpos anti-miostatina recombinantes da invenção podem ser obtidos desta maneira.

- 5 Os anticorpos anti-miostatina recombinantes humanos da invenção podem ser isolados ao examinar uma biblioteca de anticorpo combinatória recombinante. De preferência, a biblioteca é uma biblioteca scFv expositores de fago, gerada utilizando cDNAs V_L e V_H humanos preparados de mRNA isolado de células B. Os métodos para preparar e examinar tais bibliotecas são conhecidos na técnica. Os kits para gerar bibliotecas expositores de fago estão comercialmente disponíveis (por exemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, número de catálogo. 27-9400-01; e o kit expositores de fago Stratagene SurfZAP[®], catalog no. 240612). Também há outros métodos e reagentes que podem ser usados para gerar e examinar
- 10 bibliotecas de apresentação de anticorpo (vide, por exemplo, Patente No. U.S. 5.223.409; Publicação de PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); e Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), todas incorporadas aqui à guisa de referência.
- 15 20 25

- Em uma modalidade, para isolar e produzir anticorpos anti-miostatina humanos com as características desejadas, um anticorpo anti-miostatina humano como descrito aqui é primeiramente usado para selecionar seqüências de cadeia pesada e leve humanas que possuem atividade de
- 30 ligação similar a miostatina, que utiliza os métodos de impressão de epitopo descritos em Publicação de PCT No. WO 93/06213, incorporada aqui à gui-

sa de referência. As bibliotecas de anticorpo usadas neste método são, de preferência, bibliotecas scFv preparadas e examinadas como descrito em Publicação de PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); e Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), todas incorporadas aqui à guisa de referência. As bibliotecas de anticorpo scFv são, de preferência, examinadas utilizando miostatina humana como o antígeno.

Uma vez que os domínios V_L e V_H humanos iniciais foram selecionados, experimentos de "mistura e comparação" são realizados, onde pares diferentes dos segmentos V_L/V_H inicialmente selecionados são examinados para ligação de miostatina para selecionar combinações de par V_L/V_H preferidas. Adicionalmente, para aperfeiçoar adicionalmente a qualidade do anticorpo, os segmentos V_L e V_H do(s) par(es) preferido(s) pode(m) ser aleatoriamente modificado(s), de preferência, dentro da região CDR3 de V_H e/ou V_L , em um processo análogo ao processo de mutação somática in vivo responsável pela maturação de afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação de afinidade in vitro pode ser realizada ao amplificar os domínios V_H e V_L utilizando iniciadores de PCR complementares a CDR3 V_H ou CDR3 V_L , respectivamente, onde iniciadores foram "reforçados" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleotídeo em certas posições de modo que os produtos de PCR resultantes codifiquem segmentos V_H e V_L onde as mutações aleatórias foram introduzidas dentro das regiões CDR3 V_H e/ou V_L . Estes segmentos V_H e V_L aleatoriamente modificados podem ser reexaminados para ligação a miostatina.

Após a triagem e isolamento de um anticorpo anti-miostatina da invenção a partir de uma biblioteca de apresentação de imunoglobulina recombinante, os ácidos nucleicos que codificam o anticorpo selecionado podem ser recuperados do pacote de apresentação (por exemplo, a partir do genoma de fago) e subclonados dentro de outros vetores de expressão por meio de técnicas de DNA recombinante padrão. Se desejado, o ácido nucleico pode ser adicionalmente manipulado para criar outras formas de anticorpo da invenção, como descrito abaixo. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado por triagem de uma biblioteca combinatória, o

DNA que codifica o anticorpo é clonado dentro de um vetor de expressão recombinante e introduzido dentro de células hospedeiras de mamífero, como descrito acima.

Troca de classe

5 Outro aspecto da invenção proporciona um método para converter a classe ou subclasse de um anticorpo anti-miostatina em outra classe ou subclasse. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucléico que codifica V_L ou V_H que não inclui seqüências codificantes de C_L ou C_H é isolada utilizando métodos bem-conhecidos na técnica. A molécula de ácido nucléico é então operativamente ligada a uma seqüência de ácido nucléico que codifica C_L ou C_H de uma classe ou subclasse de imunoglobulina desejada. Isto pode ser realizado utilizando um vetor ou molécula de ácido nucléico que compreende uma cadeia C_L ou C_H , como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo anti-miostatina que era originalmente IgM pode se ter a classe trocada por um IgG. Adicionalmente, a troca de classe pode ser usada para converter uma subclasse IgG em outra, por exemplo, de IgG1 para IgG2. Outro método para produzir um anticorpo da invenção que compreende um isótipo desejado compreende as etapas de isolar um ácido nucléico que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti-miostatina e um ácido nucléico que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti-miostatina, isolar a seqüência que codifica a região V_H , ligar a seqüência V_H a uma seqüência que codifica um domínio constante de cadeia pesada do isótipo desejado, expressar o constructo de gene de cadeia leve e de cadeia pesada em uma célula, e coletar o anticorpo anti-miostatina com o isótipo desejado.

25 Anticorpos Desimunizados

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo pode ser desimmunizado para reduzir sua imunogenicidade utilizando as técnicas descritas em, por exemplo, Publicação de PCT Nos. WO98/52976 e WO00/34317 (incorporadas aqui à guisa de referência).

30 Anticorpos Modificados

Em outra modalidade, as moléculas de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras podem ser usadas para fabricar anticorpos anti-

miostatina modificados. Os anticorpos podem ser modificados nos domínios variáveis das cadeias pesadas e/ou leves, por exemplo, para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, uma mutação pode estar em uma ou mais regiões de CDR para aumentar ou diminuir K_D do anticorpo

5 contra miostatina, para aumentar ou diminuir k_{livre} , ou para alterar a especificidade de ligação do anticorpo. As técnicas em mutagênese sítio-dirigida são bem-conhecidas. Vide, por exemplo, Sambrook et al. e Ausubel et al., supra. Em outra modalidade, uma ou mais mutações são feitas em um resíduo de aminoácido que é conhecido como alterado comparado com a linhagem

10 germinativa em anticorpo monoclonal 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V. As mutações

15 podem ser feitas em uma região de CDR ou região de moldura de um domínio variável, ou em um domínio constante. Em uma modalidade preferida, as mutações são feitas em um domínio variável. Em algumas modalidades, uma ou mais mutações são feitas em um resíduo de aminoácido que é conhecido como alterado comparado com uma região de CDR ou região de

20 moldura de um domínio variável de uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85 ou 87 ou cuja sequência de ácido nucléico é apresentada em SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25,

25 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86 ou 88.

Em outra modalidade, a região de moldura é modificada de modo que a(s) região(ões) modificada(s) possua(m) a sequência de aminoácido do gene de linhagem germinativa correspondente. Uma mutação pode ser

30 feita em uma região de moldura ou domínio constante para aumentar a meia-vida do anticorpo anti-miostatina. Vide, por exemplo, Publicação de PCT No. WO 00/09560, incorporada aqui à guisa de referência. Uma muta-

ção em uma região de moldura ou domínio constante também pode ser feita para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para proporcionar um sítio de ligação covalente ou não-covalente a outra molécula, ou para alterar tais propriedades como fixação de complemento, ligação de FcR e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). De acordo com a invenção, um único anticorpo pode possuir mutações em qualquer uma das CDRs ou regiões de moldura do domínio variável ou no domínio constante.

Em algumas modalidades, há a partir de 1 a 8, inclusive qualquer número entre estes, mutações de aminoácido tanto nos domínios V_H como V_L do anticorpo anti-miostatina modificado comparado com o anticorpo anti-miostatina antes da mutação. Em qualquer uma destas acima, as mutações podem ocorrer em uma ou mais regiões de CDR. Ademais, qualquer uma das mutações pode ser substituições de aminoácido conservativas. Em algumas modalidades, não há mais que 5, 4, 3, 2, ou 1 alterações de aminoácido nos domínios constantes.

Anticorpos Modificados

Em outra modalidade, um anticorpo de fusão ou imunoadesina pode ser feito compreendendo todo ou uma parte de um anticorpo anti-miostatina da invenção ligado a outro polipeptídeo. Em uma modalidade preferida, apenas os domínios variáveis do anticorpo anti-miostatina são ligados ao polipeptídeo. Em outra modalidade preferida, o domínio V_H de um anticorpo anti-miostatina é ligado a um primeiro polipeptídeo, enquanto o domínio V_L de um anticorpo anti-miostatina é ligado a um segundo polipeptídeo que se associa com o primeiro polipeptídeo de tal maneira que os domínios V_H e V_L possam interagir um com o outro para formar um sítio de ligação de antígeno. Em outra modalidade preferida, o domínio V_H é separado do domínio V_L por um ligante de modo que os domínios V_H e V_L possam interagir um com o outro (vide abaixo sob Anticorpos de Cadeia Única). O anticorpo- V_H -ligante- V_L é então ligado ao polipeptídeo de interesse. Ademais, os anticorpos de fusão podem ser criados onde dois (ou mais) anticorpos de cadeia única são ligados uns aos outros. Isto é útil se alguém desejar criar um anticorpo divalente ou polivalente sobre uma cadeia de polipeptídeo única, ou se

alguém desejar criar um anticorpo biespecífico.

Para criar um anticorpo de cadeia única, (scFv) os fragmentos de DNA que codificam V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácido $(Gly_4-Ser)_3$, (SEQ ID NO:122) de modo que as seqüências V_H e V_L possam ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com os domínios V_L e V_H unidos pelo ligante flexível. Vide, por exemplo, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). O anticorpo de cadeia única pode ser monovalente, se apenas uma V_H e uma V_L forem usadas, bivalente, se duas V_H e V_L forem usadas, ou polivalente, se mais de duas V_H e V_L forem usadas. Os anticorpos biespecíficos ou polivalentes que podem ser gerados se ligam especificamente à miostatina e a outra molécula.

Em outras modalidades, outros anticorpos modificados podem ser preparados utilizando anticorpo anti-miostatina que codifica moléculas de ácido nucléico. Por exemplo, "Kappa bodies" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diabodies" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), ou "Janusins" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) e Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992)) podem ser preparados utilizando técnicas biológicas moleculares padrão que seguem as instruções do relatório descritivo.

Os anticorpos biespecíficos ou fragmentos de ligação de antígeno podem ser preparados através de uma variedade de métodos que incluem fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Vide, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Ademais, os anticorpos biespecíficos podem ser formados como "anticorpos bivalentes" ou "Janusins". Em algumas modalidades, o anticorpo biespecífico se liga a dois epitopos diferentes de miostatina. Em algumas modalidades, o anticorpo biespecífico possui uma primeira cadeia pesada e uma primeira cadeia leve de anticorpo mono-

clonal 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, 1_268_1, 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; ou
 5 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V e um anticorpo com cadeia pesada e cadeia leve adicionais. Em algumas modalidades, a cadeia leve e cadeia pesada adicionais também pertencem a um dos anticorpos monoclonais adicionados, porém são diferentes das primeiras cadeia pesada e leve.

Em algumas modalidades, os anticorpos modificados descritos
 10 acima são preparados utilizando um ou mais dos domínios variáveis ou regiões de CDR de um anticorpo monoclonal anti-miostatina humano proporcionado aqui.

Anticorpos Derivatizados e Marcados

Um anticorpo anti-miostatina ou parte de ligação de antígeno da
 15 invenção podem ser derivatizados ou ligados a outra molécula (por exemplo, outro peptídeo ou proteína). Em geral, os anticorpos ou parte destes são derivatizados de modo que a ligação de miostatina não seja afetada de forma contrária pela derivatização ou marcação. Conseqüentemente, os anticorpos e partes de anticorpo da invenção pretendem incluir tanto formas intactas como modificadas dos anticorpos anti-miostatina humanos descritos
 20 aqui. Por exemplo, um anticorpo ou parte de anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por acoplamento químico, fusão genética, associação não-covalente ou de outra maneira) a uma ou mais entidades moleculares, tal como outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um anti-
 25 corpo bivalente), um agente de detecção, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou peptídeo que pode mediar a associação do anticorpo ou parte de anticorpo com outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou uma cauda de poli-histidina).

Um tipo de anticorpo derivatizado é produzido ao reticular dois
 30 ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo, para criar anticorpos biespecíficos). Os reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, que possuem dois grupos distintamente reativos

separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster m-maleimidobenzóil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncionais (por exemplo, suberato de dissuccinimida). Tais ligantes estão disponíveis a partir de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

5 Outro tipo de anticorpo derivatizado é um anticorpo marcado. Os agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou parte de ligação de antígeno da invenção pode ser derivatizado incluem compostos fluorescentes, inclusive fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftaleno-sulfonila, ficoeritrina, fósforos de lantânio e similares. Um anticorpo também pode ser marcado com enzimas que são
10 úteis para detecção, tal como peroxidase de raiz forte, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase e similares. Quando um anticorpo for marcado com uma enzima detectável, o mesmo é detectado ao adicionar reagentes adicionais que a enzima utiliza para produzir um produto de reação que pode ser discernido. Por exemplo, quando o agente peroxidase da raiz forte estiver presente, a adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina resulta em um produto de reação colorido, que é detectável. Um anticorpo também pode ser marcado com biotina, e detectado através de medida indireta de ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo também
15 pode ser marcado com um epítipo de polipeptídeo predeterminado reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par zíper de leucina, sítios de ligação de anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epítipo). Em algumas modalidades, os marcadores são ligados por braços espaçadores de diversos comprimentos para reduzir o
20 congestionamento estérico potencial.

25 Um anticorpo anti-miostatina também pode ser derivatizado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metila ou etila, ou um grupo de carboidrato. Estes grupos são úteis para aperfeiçoar as características biológicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a meia-vida no soro.
30

Composições Farmacêuticas e Kits

A invenção também se refere a composições que compreendem

um anticorpo anti-miostatina humano com propriedades inibidoras.

Os anticorpos anti-miostatina antagonista da invenção são úteis para prevenir ou tratar uma grande faixa de condições e distúrbios em que é desejado aumentar a massa de músculo esquelético e/ou óssea. Em alguns casos, tais condições e distúrbios podem ser relacionados à idade ou relacionados à doença. Um anticorpo anti-miostatina antagonista da invenção pode ser usado para tratar, prevenir ou inibir a perda de massa e resistência muscular relacionadas à idade inclusive atrofia muscular que resulta, por exemplo, em imobilização.

Ademais, um anticorpo anti-miostatina antagonista da invenção é útil para tratar ou prevenir perda muscular em doenças consuntivas ou outras doenças ou condições, associadas com perda de massa muscular inclusive, porém sem caráter limitativo, trauma (inclusive trauma de músculo, nervo e osso), queimaduras, AIDS, câncer, fraturas no quadril (especialmente nos idosos), prótese de articulação, lesões agudas no joelho, artrite, insuficiência renal crônica (CRF), insuficiência cardíaca congestiva (CHF), doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), esclerose múltipla (MS), doença de Parkinson, doença crônica crítica, lesão no sistema nervoso central (CNS), acidente vascular cerebral, caquexia, síndrome de distrofias musculares, lesão em cirurgia e articulação.

Os anticorpos anti-miostatina antagonistas da invenção também são úteis para tratar condições metabólicas. Tais condições incluem diabetes melito tipo 2, síndromes metabólicas tais como síndrome X, resistência à insulina, tolerância à glicose comprometida e obesidade.

Ademais, um anticorpo anti-miostatina antagonista da invenção é útil para tratar ou prevenir distúrbios associados com perda óssea, inclusive, porém sem caráter limitativo, osteopenia e osteoporose relacionadas à idade ou hormônio, osteoartrite e fraturas relacionadas à osteoporose.

O tratamento pode envolver a administração de um ou mais anticorpos monoclonais anti-miostatina inibidores da invenção, ou fragmentos de ligação de antígeno destes, sozinhos ou com um veículo farmacologicamente aceitável. Os anticorpos antimiostatina inibidores da invenção e as

composições que compreendem os mesmos, podem ser administrados em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos, diagnósticos ou profiláticos. Os agentes terapêuticos adicionais incluem agentes de antidis-
trofia muscular (inclusive esteróides como prednisona, deflazacorte), e este-
5 róides anabólicos, albuterol, suplementos nutritivos tais como creatina, e an-
tibióticos tal como gentamicina. Os agentes terapêuticos adicionais também
incluem agentes antidiabetes que incluem, porém sem caráter limitativo,
metformina, sulfoniluréias, insulina, pramlintida (SYMLIN®), TZDs tais como
rosiglitazona (Avandia®) e pioglitazona (Actos®), análogos de GLP-1, tais
10 como exenitida, e inibidores de DPP-IV, tal como LAF237. Ademais, os a-
gentes terapêuticos adicionais incluem agentes antiosteoporose que inclu-
em, porém sem caráter limitativo, bisfosfonatos tais como alendronato (Fo-
samax®) e risedronato (Actonel®), calcitonina (Miacalcin®), Raloxifeno (E-
vista®), agentes hormonais tais como estrogênio e paratireóide. Tais agen-
15 tes adicionais podem ser incluídos na mesma composição ou administrados
separadamente. Como usado aqui, "veículo farmacologicamente aceitável"
significa qualquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos,
agentes antibacterianos e antifúngos, agentes de atraso isotônicos e de
absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Alguns exem-
20 plos de veículos farmacologicamente aceitáveis são água, salina, salina tam-
ponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, bem como combi-
nações destes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos,
por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de
sódio na composição. Exemplos adicionais de substâncias farmaceutica-
25 mente aceitáveis são agentes umectantes ou quantidades menores de subs-
tâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, conser-
vantes ou tampões, que aumentam a vida útil ou efetividade do anticorpo.

As composições desta invenção podem estar em uma variedade
de formas, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas,
30 tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis),
dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e suposi-
tórios. A forma preferida depende do modo programado de administração e

aplicação terapêutica. As composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis, tais como composições similares às aquelas usadas para imunização passiva de humanos. O modo preferido de administração é parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas podem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada a alta de concentração de fármaco. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas ao incorporar o anticorpo antimiotatina na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas ao incorporar o composto ativo dentro de um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos dentre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução estéril anteriormente filtrada deste. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento tal como lecitina, através da conservação do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e através do uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser induzida ao incluir na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Em uma modalidade, o anticorpo é administrado em uma formulação como uma solução aquosa estéril que possui um pH que varia a partir de cerca de 5,0 a cerca de 6,5 e que compreende de cerca de 1 mg/ml a cerca de 200 mg/ml de anticorpo, de cerca de 1 milimolar a cerca de 100

milimolar de tampão de histidina, de cerca de 0,01 mg/ml a cerca de 10 mg/ml de polisorbato 80, de cerca de 100 milimolar a cerca de 400 milimolar de trealose, e de cerca de 0,01 milimolar a cerca de 1,0 milimolar de diidrato dissódico EDTA.

5 Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a rota/modo preferido de administração é infusão subcutânea, intramuscular, ou intravenosa. Como será avaliado pelo versa-
do na técnica, a rota e/ou modo de administração irá variar dependendo dos
10 resultados desejados.

Em certas modalidades, o composto ativo para composições de anticorpo pode ser preparado com um veículo que irá proteger o anticorpo contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, inclusive implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de entrega microen-
15 capsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como, acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos pelo versado na técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release
20 Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

Em certas modalidades, um anticorpo antimiotatina da invenção pode ser oralmente administrado, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo edível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se deseja-
25 dos) pode ser envolvido em uma cápsula de gelatina com revestimento duro ou macio, comprimido formando comprimidos, ou diretamente incorporados na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os anticorpos anti-miotatina podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingestíveis, comprimidos orais, pastilhas, cápsulas, elixires,
30 suspensões, xaropes, hóstias e similares. Para administrar um composto da invenção por administração que não parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com um material para pre-

venir sua inativação.

Os compostos ativos adicionais também podem ser incorporados dentro das composições. Em certas modalidades, um anticorpo anti-miostatina inibidor da invenção é co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, sem caráter limitativo, anticorpos que se ligam a outros alvos, agentes anti-neoplásicos, agentes antitumor, agentes quimioterapêuticos, análogos de peptídeo que inibem miostatina, ou anticorpos ou outras moléculas que se liga a receptores de membrana Tipo II e previnem sua ligação a ou ativação por miostatina. Tais terapias de combinação podem requerer dosagens inferiores do anticorpo anti-miostatina inibidor bem como os agentes co-administrados, desta maneira, evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas com as diversas monoterapias.

Os anticorpos anti-miostatina inibidores da invenção e composições que compreendem os mesmos também podem ser administrados em combinação com outros regimes terapêuticos, em particular, em combinação com exercício e/ou suplementos alimentares (inclusive nutritivos).

Em certas modalidades, um anticorpo anti-miostatina inibidor da invenção é co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais discutidos, *supra*. Estes agentes incluem aqueles que inibem miostatina. Ademais, tais terapias de combinação também podem ser usadas para tratar, prevenir ou inibir qualquer doença e condição mencionadas antes. Tais terapias de combinação podem requerer dosagens inferiores do anticorpo anti-miostatina inibidor bem como os agentes co-administrados, desta maneira, evitando as possíveis toxicidades ou complicações associadas com as diversas monoterapias.

As composições da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou parte de ligação de antígeno da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou parte de

anticorpo pode variar de acordo com fatores, tais como, o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou parte de anticorpo produzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz também é uma em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial do anticorpo ou parte de anticorpo é excedido em peso pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é usada em indivíduos antes ou em uma etapa anterior da doença, a quantidade profilaticamente eficaz pode ser menor do que a quantidade terapêuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, diversas doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de dosagem única para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem única como usada aqui se refere a unidades fisicamente descontínuas adaptadas como dosagens únicas para os animais mamíferos que serão tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação das formas de dosagem única da invenção é prescrita e diretamente dependente (a) das características exclusivas do anticorpo anti-miostatina ou parte deste e do efeito terapêutico ou profilático particular que será obtido, e (b) as limitações inerentes na técnica para compor tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Uma faixa exemplificativa, não-limitativa de uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou parte de anticorpo da invenção é 0,025 a 50 mg/kg, mais preferivelmente, 0,1 a 50 mg/kg, mais preferivelmente, 0,1 a 25, 0,1 a 10 ou 0,1 a 3 mg/kg. Em algumas modalida-

des, uma formulação contém 5 mg/ml de anticorpo em um tampão de 20mM de citrato de sódio, pH 5,5, 140mM de NaCl e 0,2 mg/ml de polysorbato 80. Deve ser observado que os valores de dosagem podem variar com o tipo e gravidade da condição que será suavizada. Deve ser adicionalmente entendido que em qualquer indivíduo particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados com o tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e da opinião profissional da pessoa que está administrando ou supervisionando a administração das composições, e que as faixas de dosagem estabelecidas aqui são apenas exemplificativas e não pretendem limitar o escopo ou prática da composição reivindicada.

Outro aspecto da presente invenção proporciona kits que compreendem um anticorpo anti-miostatina ou parte de ligação de antígeno da invenção ou uma composição que compreende tal anticorpo ou parte. Um kit pode incluir, além do anticorpo ou composição, agentes diagnósticos ou terapêuticos. Um kit também pode incluir instruções para uso em um método diagnóstico ou terapêutico. Em uma modalidade preferida, o kit inclui o anticorpo ou uma composição que compreende o mesmo e um agente diagnóstico que pode ser usado em um método descrito abaixo. Em outra modalidade preferida, o kit inclui o anticorpo ou uma composição que compreende o mesmo e um ou mais agentes terapêuticos que podem ser usados em um método descrito abaixo.

Métodos Diagnósticos de Uso

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos diagnósticos. Os anticorpos anti-miostatina podem ser usados para detectar miostatina em uma amostra biológica *in vitro* ou *in vivo*.

Os anticorpos anti-miostatina podem ser usados em um imunoenensaio convencional, que inclui, sem caráter limitativo, ELISA, RIA, citometria de fluxo, imunistoquímica em tecido, Western blot ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-miostatina da invenção podem ser usados para detectar miostatina de humanos. Em outra modalidade, os anticorpos anti-miostatina podem ser usados para detectar miostatina de, por exemplo, camundongos, macacos cinomólgo, rato, cão, codorna, galinha, peru, porco e

cavalo.

A invenção proporciona um método para detectar miostatina em uma amostra biológica que compreende colocar a amostra biológica em contato com um anticorpo anti-miostatina da invenção e detectar o anticorpo
 5 ligado. Em uma modalidade, o anticorpo anti-miostatina está diretamente marcado com um marcador detectável. Em outra modalidade, o anticorpo anti-miostatina (o primeiro anticorpo) não está marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que pode ligar o anticorpo anti-miostatina está marcado. Como é bem-conhecido pelo versado na técnica, um segundo anticorpo
 10 po que é selecionado é capaz de se ligar especificamente a espécies particulares e classe do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-miostatina for um IgG humano, então o anticorpo secundário poderia ser um IgG anti-humano. Outras moléculas que podem se ligar a anticorpos incluem, sem caráter limitativo, Proteína A e Proteína G, sendo que ambas estão
 15 comercialmente disponíveis, por exemplo, a partir de Pierce Chemical Co.

Os marcadores adequados para o anticorpo ou anticorpo secundário foram mostrados supra, e incluem diversas enzima, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase da raiz forte, fosfatase
 20 alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinasterase; exemplos de complexos de grupo prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material
 25 luminescente inclui luminol; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Em outras modalidades, a miostatina pode ser analisada em uma amostra biológica por meio de um imunoensaio de concorrência que utiliza modelos de miostatina marcados com uma substância detectável e
 30 um anticorpo anti-miostatina não-marcado. Nesta análise, a amostra biológica, os modelos de miostatina marcados e o anticorpo anti-miostatina são combinados e a quantidade de modelo de miostatina marcado ligado ao an-

ticorpo não-marcado é determinada. A quantidade de miostatina na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de modelo de miostatina marcado ligado ao anticorpo anti-miostatina.

Alguém pode utilizar os imunoensaios descritos acima para inúmeros propósitos. Por exemplo, os anticorpos anti-miostatina podem ser usados para detectar miostatina em células cultivadas. Em uma modalidade preferida, os anticorpos anti-miostatina são usados para determinar a quantidade de miostatina produzida por células que foram tratadas com diversos compostos. Este método pode ser usado para identificar compostos que modulam níveis de proteína miostatina. De acordo com este método, uma amostra de células é tratada com um composto de teste durante um período de tempo, enquanto outra amostra é deixada não-tratada. Se o nível total de miostatina for medido, as células são lisadas e o nível total de miostatina é medido utilizando um dos imunoensaios descritos acima. O nível total de miostatina nas células tratadas versus não-tratadas é comparado para determinar o efeito do composto de teste.

Um imunoensaio preferido para medir os níveis totais de miostatina é a citometria de fluxo ou imunoistoquímica. Métodos, tais como ELISA, RIA, citometria de fluxo, Western blot, imunoistoquímica, marcação de superfície celular de proteína de membrana integral e imunoprecipitação são bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Harlow and Lane, supra. Ademais, os imunoensaios podem ser aumentados em escala para seleção de alto rendimento para testar um grande número de compostos tanto para ativação como inibição de expressão de miostatina.

Os anticorpos anti-miostatina da invenção também podem ser usados para determinar os níveis de miostatina em um tecido ou soro. Em algumas modalidades, o tecido é um tecido doente. Em algumas modalidades do método, um tecido ou uma biópsia do mesmo é excisada de um paciente. O método compreende as etapas de administrar um anticorpo anti-miostatina marcado de forma detectável ou uma composição que o compreende em um paciente necessitado de tal teste diagnóstico e submeter o paciente a análise de imagens para determinar o local dos tecidos que expres-

sam miostatina. A análise de imagens é bem-conhecida na técnica médica, e inclui, sem caráter limitativo, análise de raio-x, imagens por ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CT). O anticorpo pode ser marcado com qualquer agente adequada para imagem *in vivo*, por exemplo, um agente de contraste, tal como, bário, que pode ser usado para análise de raio-x ou um agente de contraste magnético, tal como, um quelato de gadolínio, que pode ser usado para MRI ou CT. Outros agentes de marcação incluem, sem caráter limitativo, radioisótopos, tal como, ^{99}Tc . Em outra modalidade, o anticorpo anti-miostatina será não-marcado e será representado ao administrar um segundo anticorpo ou outra molécula que é detectável e que pode se ligar ao anticorpo anti-miostatina. Em uma modalidade, uma biópsia é obtida do paciente para determinar se o tecido de interesse expressa miostatina.

Métodos Terapêuticos de Uso

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método para inibir a atividade de miostatina ao administrar um anticorpo anti-miostatina em um paciente necessitado do mesmo. Qualquer um dos tipos de anticorpos descritos aqui pode ser usado de forma terapêutica. Em diversas modalidades, o anticorpo anti-miostatina é um anticorpo humano, quimérico ou humanizado. Em uma modalidade preferida, a miostatina é humana e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero que expressa uma miostatina com a qual o anticorpo anti-miostatina reage cruzadamente. O anticorpo pode ser administrado em um mamífero não-humano que expressa miostatina com a qual o anticorpo reage cruzadamente (ou seja, um rato, um camundongo ou um macaco cino-mólgo) para propósitos veterinários ou como um modelo de animal de doença humana. Tais modelos de animal podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica de anticorpos desta invenção.

Estes anticorpos podem ser usados para promover crescimento muscular, ganho de peso e auxílio na prevenção de fraqueza em animais (gado, suíno, carneiro, cavalos, frangos, perus e peixes) e animais de companhia (cães, gatos e cavalos).

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método para promover o crescimento muscular, ganho de peso e auxílio na prevenção de fraqueza em gado, suíno, carneiro, frangos, perus, cavalos, peixes, cães e gatos necessitados deste que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno como descrito aqui.

Como usado aqui, o termo "uma condição que pode ser prevenida ou tratada ao reduzir a atividade miostatina" pretende incluir doenças e outros distúrbios onde a presença de altos níveis de miostatina em um indivíduo que sofre do distúrbio foi mostrada como ou suspeita de ser tanto responsável pela patofisiologia do distúrbio como um fator que contribui para um agravamento do distúrbio. Tais distúrbios podem ser evidenciados, por exemplo, através de um aumento nos níveis de miostatina em tecidos e fluidos ou Smad 2 ou 3 fosforilado em tecido muscular nas células afetadas ou tecidos de um indivíduo que sofre do distúrbio. O aumento nos níveis de miostatina podem ser detectados, por exemplo, utilizando um anticorpo anti-miostatina, como descrito acima.

Em outra modalidade preferida, um anticorpo anti-miostatina pode ser administrado em um paciente que expressa níveis inapropriadamente altos de miostatina. É conhecido na técnica que a expressão de alto nível de miostatina pode resultar em uma variedade de condições debilitantes, perda óssea e em acúmulo de massa de gordura. Em uma modalidade, o dito método se refere ao tratamento de doenças e condições onde deseja-se reduzir a perda de ou aumentar a massa de músculo esquelético, para reduzir a perda óssea ou para aumentar a massa óssea e/ou reduzir massa de gordura neutralizando os efeitos de miostatina. Tais condições e doenças são mencionadas *supra*.

Em outra modalidade preferida, um anticorpo anti-miostatina pode ser administrado em um paciente que não expressa níveis inapropriados de miostatina (altos ou baixos), porém cuja condição ainda será tratada ou prevenida com êxito utilizando o tratamento antimiostatina. Em uma modalidade, o dito método se refere ao tratamento de doenças e condições em que deseja-se inibir a atividade de miostatina para tratar a perda de ou para a-

perfeiçãoar a massa de músculo esquelético, para tratar a perda óssea ou para aumentar a massa óssea e/ou para tratar a massa de gordura neutralizando os efeitos de miostatina. Tais doenças e condições são conhecidas na técnica e poderiam incluir doenças e condições que se associam com uma
5 variedade de condições debilitantes que podem incluir perda óssea e acúmulo de massa de gordura, por exemplo, doenças degenerativas relacionadas à idade e condições normais relacionadas à idade.

O anticorpo pode ser administrado uma vez, porém de forma mais preferida, é administrado múltiplas vezes. O anticorpo pode ser admi-
10 nistrado de três vezes ao dia a uma vez a cada seis meses ou por mais tempo. A administração pode ocorrer através de um programa tal como três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três
15 meses e uma vez a cada seis meses. O anticorpo também pode ser administrado de forma contínua através de uma mini bomba. O anticorpo pode ser administrado através de uma rota oral, mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular ou parenteral. O anticorpo pode ser administrado uma vez, pelo menos duas vezes ou pelo menos durante o pe-
20 ríodo de tempo até a condição ser tratada, paliada ou curada. O anticorpo será geralmente administrado durante o tempo em que a condição estiver presente. O anticorpo será geralmente administrado como parte de uma composição farmacêutica como descrito *supra*. A dosagem de anticorpo estará geralmente na faixa de 0,1 a 100 mg/kg, mais preferivelmente, 0,5 a 50
25 mg/kg, mais preferivelmente, 1 a 20 mg/kg, e ainda mais preferivelmente, 1 a 10 mg/kg. A concentração de soro do anticorpo pode ser medida por meio de qualquer método conhecido na técnica.

A co-administração do anticorpo com um agente terapêutico adicional (terapia de combinação) inclui administrar uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo anti-miostatina e o agente terapêutico adi-
30 cional bem como administrar duas ou mais composições farmacêuticas separadas, sendo que uma compreende o anticorpo anti-miostatina e a(s) ou-

tra(s) compreende(m) o(s) agente(s) terapêutico(s) adicional(is). Ademais, embora a co-administração ou terapia de combinação signifique geralmente que o anticorpo e agentes terapêuticos adicionais são administrados simultaneamente, a mesma também inclui casos onde o anticorpo e agentes terapêuticos adicionais são administrados em momentos diferentes. Por exemplo, o anticorpo pode ser administrado uma vez a cada três dias, enquanto o agente terapêutico adicional é administrado uma vez ao dia. Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado antes ou subsequente ao tratamento do distúrbio com o agente terapêutico adicional, por exemplo, após a terapia do paciente falhar com o agente adicional. De forma similar, a administração do anticorpo anti-miostatina pode ser administrada antes ou subsequente a outra terapia, tal como exercício e/ou suplementos alimentares (inclusive nutritivos). O anticorpo e um ou mais agentes terapêuticos adicionais (a terapia de combinação) pode ser administrado uma vez, duas vezes ou pelo menos durante o período de tempo até a condição ser tratada, paliada ou curada. De preferência, a terapia de combinação é administrada múltiplas vezes. A terapia de combinação pode ser administrada de três vezes ao dia a uma vez a cada seis meses. A administração pode ocorrer através de um programa tal como de três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, e uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses e uma vez a cada seis meses, ou pode ser administrada de forma contínua através de uma mini bomba. A terapia de combinação pode ser administrada através de uma rota oral, mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular ou parenteral.

Terapia Genética

As moléculas de ácido nucléico da presente invenção podem ser administradas em um paciente necessitado destas através de terapia genética. A terapia pode ser tanto *in vivo* como *ex vivo*. Em uma modalidade preferida, as moléculas de ácido nucléico que codificam tanto uma cadeia pesada como uma cadeia leve são administrada em um paciente. Em uma modalidade preferida, as moléculas de ácido nucléico são administradas de modo

que estas sejam estavelmente integradas dentro de cromossomos de células B devido ao fato de estas células serem especializadas para produzir anticorpos. Em uma modalidade preferida, as células precursoras B são transfectadas ou infectadas *ex vivo* e retransplantadas dentro de um paciente necessitado destas. Em outra modalidade, as células precursoras B ou outras células são infectadas *in vivo* utilizando um vírus conhecido por infectar o tipo de célula de interesse. Os vetores típicos usados para terapia genética incluem lipossomas, plasmídeos e vetores virais. Os vetores virais exemplificativos são retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associado. Após a infecção tanto *in vivo* como *ex vivo*, os níveis de expressão de anticorpo podem ser monitorados ao retirar uma amostra do paciente tratado e ao utilizar qualquer imunoensaio conhecido na técnica ou discutido aqui.

Em uma modalidade preferida, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação de antígeno desta de um anticorpo anti-miostatina e que expressa a molécula de ácido nucléico. Em outra modalidade, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia leve ou uma parte de ligação de antígeno desta de um anticorpo anti-miostatina e que expressa a molécula de ácido nucléico. Em um método mais preferido, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação de antígeno desta e uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia leve ou a parte de ligação de antígeno desta de um anticorpo anti-miostatina da invenção e que expressa as moléculas de ácido nucléico. O método de terapia genética também pode compreender a etapa de administrar um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como aqueles mencionados, *supra*.

Para que esta invenção possa ser melhor compreendida, os seguintes exemplos são estabelecidos. Estes exemplos servem apenas para propósitos de ilustração e não devem ser interpretados de forma alguma como uma limitação do escopo da invenção.

EXEMPLO IGeração de Hibridomas que Produzem Anticorpo Anti-miostatina

Os anticorpos da invenção foram preparados, selecionados e analisados como se segue:

- 5 Camundongos XenoMouse™ com oito a dez semanas de idade foram imunizados de forma intraperitoneal ou em suas patas traseiras tanto com uma miostatina madura c-terminal (10µg/dose/camundongo) (R&D Systems, Catalog Nº 788-G8) como com uma miostatina madura cinomóloga de comprimento total. Esta dose foi repetida sete vezes durante um período de
- 10 três a quatro semanas. Quatro dias antes da fusão, os camundongos foram administrados com uma injeção final da miostatina em PBS. Os linfócitos do baço e linfonodo de camundongos imunizados foram fundidos com a linha celular de mieloma não-secretor P3-X63-Ag8.653, e três células fundidas foram submetidas à seleção de HAT como anteriormente descrito (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981). Um grupo de hibridomas foi
- 15 recuperada sendo que todos secretam anticorpos humanos específicos de miostatina IgG2 ou IgG4.

Protocolo de análise ELISA GDF8 e GDF11:

- A análise ELISA foi usada para detectar a ligação de anticorpo a
- 20 miostatina ou GDF11. A miostatina ou GDF11 foi revestida sobre uma placa microtiter de 96 cavidades Immulon (superfície NUNC-Immuno® plate Maxi-Sorp®, Nalge Nunc International, Cat. No.439454) em 4µg/ml em 50mM de tampão de bicarbonato de sódio durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas, e então bloqueadas com salina tamponada com fosfato (PBS) que
- 25 contém 0,1% de Tween-20 e 0,5% de albumina de soro bovino. Os anticorpos foram adicionados às placas ELISA bloqueadas, incubados durante 1 hora, e lavados com PBS com Tween-20. A ligação foi detectada por peroxidase de raiz forte de IgG anti-humano (Pierce Cat. No. 31420) seguida pela
- 30 adição de ABTS (Pierce Cat. No. 37615). As medidas colorimétricas foram realizadas em 405nm em uma leitora de micro-placa (Utilizou-se SpectraMax Plus 384, Molecular Devices).

Onze hibridomas foram selecionados para estudo adicional e

foram designados 1_116_1, 1_136_3, 1_257_1, 1_46_1, 2_112_1, 1_314_1, 1_66_1, 2_43_1, 2_177_1, 1_132_1, e 1_268_1. Os onze hibridomas foram depositados sob termos de acordo com o Tratado de Budapeste com American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 em 10 de fevereiro de 2005. Os hibridomas foram designados com as seguintes referências numéricas:

	<u>Anticorpo</u>	<u>Identificador de Hibridoma</u>	<u>No. de Referência ATCC.</u>
	1_116_1	PF8-1-116-1 (LN 15902)	PTA-6566
	1_132_1	PF8-1-132-1 (LN 15903)	PTA-6567
10	1_136_3	PF8-1-136-3 (LN 15904)	PTA-6568
	1_257_1	PF8-1-257-1 (LN 15905)	PTA-6569
	1_268_1	PF8-1-268-1 (LN 15906)	PTA-6570
	1_314_1	PF8-1-314-1 (LN 15907)	PTA-6571
	1_46_1	PF8-1-46-1 (LN 15908)	PTA-6572
15	1_66_1	PF8-1-66-1 (LN 15909)	PTA-6573
	2_112_1	PF8-2-112-1 (LN 15910)	PTA-6574
	2_43_1	PF8-2-43-1 (LN 15911)	PTA-6575
	2_177_1	PF8-2-177-1 (LN 15912)	PTA-6576

EXEMPLO II

20 Seqüências de Anticorpos Anti-miostatina Preparados de Acordo com a Invenção

Para analisar a estrutura de anticorpos produzidos de acordo com a invenção, os ácidos nucleicos que foram clonados codificam fragmentos de cadeia pesada e cadeia leve de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais anti-miostatina.

A clonagem e seqüenciamento das regiões variáveis de anticorpo, foram realizados como se segue: Poly(A)⁺ mRNA foi isolado utilizando um kit Fast-Track (Invitrogen) de aproximadamente 2×10^5 células de hibridoma derivadas de camundongos XenoMouse[®] imunizados com miostatina.

30 O cDNA foi sintetizado a partir do mRNA utilizando iniciadores aleatórios. O cDNA aleatoriamente iniciado foi amplificado utilizando iniciadores de domínio variável específicos de família V_K ou V_H humanos (Marks et al., "Oligonu-

cleotide iniciadores for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes". *Eur. J. Immunol.* 21:985-991 (1991)) ou um iniciador V_H universal humano [MG-30, 5'-CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG-3'] (SEQ ID NO: 91), em conjunto com iniciadores específicos para a região constante C_γ2 humana, MG-40d [5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3'] (SEQ ID NO: 92) ou uma região constante C_κ [hκP2; como anteriormente descrito em Green et al., 1994]. As moléculas de ácido nucléico que foram obtidas codificam transcrições de cadeia pesada e cadeia leve humanas kappa de hibridomas que produzem anti-miostatina por amplificação PCR de poly(A⁺) RNA que utiliza os iniciadores descritos acima. Os produtos de PCR foram clonados [pCRII (Invitrogen)] utilizando um kit de clonagem TA (Invitrogen) e ambas foram seqüenciadas utilizando kits de seqüenciamento terminador de corante Prism (Applied Biosystems Inc) e uma máquina de seqüenciamento ABI 377 (Applied Biosystems Inc). Todas as seqüências foram analisadas por alinhamentos com o "diretório de seqüência BASE V" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) utilizando programas de software MacVector[®] (Accelrys, San Diego, CA) e Geneworks[®] (Hindmarsh, S.A. Australia).

Para obter a seqüência de ácido nucléico expressa de comprimento total de anticorpos produzida de acordo com a invenção, os ácidos nucléicos que foram clonados codificam regiões de codificação de cadeia pesada e cadeia leve de comprimento total de hibridomas que produzem anticorpos anti-miostatina. A clonagem e seqüenciamento foram realizados como se segue: Poly(A)⁺ mRNA foi isolado utilizando um Mini Kit RNeasy (Qiagen) e o cDNA sintetizado do mRNA com o kit RT-para-PCR Advantage (BD Biosciences) que utiliza iniciação por oligo(dT). O cDNA iniciado por oligo(dT) foi amplificado em duas reações independentes que utilizam iniciadores degenerados designados para se hibridizar na região não-traduzida 5' (5'UTR) de segmentos de gene V_H ou V_κ humano (TABELA 2A e 2B) em conjunto com iniciadores não-degenerados específicos para regiões em 3'UTR de IGHG2 ou IGHG4 [G_3UTR_R, 5'TACGTGCCAAGCATCCTCGC]

- (SEQ ID NO: 93) ou IGH [K_3UTR_R, 5'AGGCTGGAACTGAGGAGCAGGTG] (SEQ ID NO: 94). A amplificação foi realizada utilizando o kit Expand High Fidelity PCR (Roche) e um DNA Engine PTC-200 (MJ Research) com ciclagem como se segue: 2 minutos a 94°C; 23x (30 segundos a 94°C, 50 segundos a 52°C, 2 minutos a 72°C); 8 minutos a 72°C. Tanto para reação em cadeia pesada como em cadeia leve, os produtos de PCR de duas PCRs independentes foram clonados em pCR2.1 utilizando um kit de clonagem TOPO-TA (Invitrogen) e ambas as cadeias de dois clones foram seqüenciadas utilizando química de Grills 16th BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) e um Analisador de DNA 3730xl (Applied Biosystems Inc).

TABELA 2A

Iniciadores de Amplificação 5' de Cadeia Pesada e Leve:

Nome de iniciador	Seqüência de iniciador	SEQ ID NO
VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC	95
VH3a_5UTR_F	HVTHTCCACTYGGTGATCRGCACTG	96
VH3c_5UTR_F	ATTYRGTGATCAGSACTGAACASAG	97
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCYCWVYCAGGACACAGC	98
VK2_5UTR_F	CACCAGGKGATTTGCATATTTTCCC	99
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYYTG	100

TABELA 2B

- 15 Iniciadores 5' usados para amplificação de cadeias pesada e leve de anti-corpo anti-miostatina:

Clone	Iniciador Direto de Cadeia Pesada	Iniciador Direto de Cadeia Leve
1_116_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_132_1	VH1a_5UTR_F	VK2_5UTR_F
1_136_3	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_257_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_314_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_46_1	VH1a_5UTR_F	VK2_5UTR_F
2_112_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F

Clone	Iniciador Direto de Cadeia Pesada	Iniciador Direto de Cadeia Leve
1_268_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
1_66_1	VH3a_5UTR_F	VK1a_5UTR_F
2_177_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F
2_43_1	VH3c_5UTR_F	VK3_5UTR_F

Análise de Utilização de Gene

A partir da seqüência de ácido nucléico e seqüência de aminoácido prognóstica dos anticorpos, o uso de gene foi identificado para cada cadeia de anticorpo. A Tabela 3 estabelece a utilização de gene de clones de hibridoma selecionados de anticorpos de acordo com a invenção:

TABELA 3

Utilização de Segmento de Gene de Cadeia Pesada e Leve:

Clone	Utilização da cadeia pesado de gene					Utilização da cadeia de gene kappa		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	C _H	SEQ ID NO:	V _k	J _k
1_116_1	1	V3-21	D5-5	JH4B	G2	3	A30	JK1
1_132_1	5	V1-02	D4-23	JH6B	G2	7	A3	JK4
1_136_3	9	V3-21	D5-5	JH4B	G2	11	A30	JK1
1_257_1	13	V3-21	D5-12	JH6B	G2	15	A30	JK3
1_314_1	17	V3-21	-	JH6B	G2	19	A30	JK1
1_46_1	21	V1-02	D4-23	JH6B	G2	23	A3	JK4
2_112_1	25	V3-23	D1-7	JH3B	G4	27	L2	JK4
1_268_1	29	V3-21	D1-26	JH4B	G2	31	A30	JK4
1_66_1	33	V3-21	D5-5	JH4B	G2	35	A30	JK3
2_177_1	37	V3-21	D1-7	JH3B	G4	39	L2	JK4
2_43_1	41	V3-23	D1-7	JH3B	G4	43	L2	JK4

As mutações desenvolvidas durante a maturação de anticorpo das regiões de moldura foram modificadas novamente nas seqüências de linhagem germinativa como ilustrado no alinhamento de seqüência da Figura 19. Especificamente, o resíduo 12 na cadeia pesada de anticorpo monoclonal 2_112_1 (SEQ ID NOs: 26 e 77) foi modificado de Ile para Val. Na cadeia leve (SEQ ID NOs: 28 e 79), o resíduo 58 foi modificado de Phe para Ile e o resíduo 85 foi modificado de Ile para Val. A mutagênese de resíduos especí-

ficos das cadeias pesadas e leves de anticorpo 2_112_1 foi realizada ao designar iniciadores que utilizam o Kit de Mutagênese Sítio-Dirigida Quick-Change de Stratagene, de acordo com as instruções do fabricante. As mutações foram confirmadas por seqüenciamento automático, e os insertos mutagenizados foram subclonados em vetores de expressão. Estes vetores de expressão foram transfectados em células NS0 (ECACC Nº 85110503) e HEK-293T (American Type Culture Collection) para expressar anticorpos recombinantes da invenção. O anticorpo resultante que possui regiões de moldura novamente modificadas é designado anticorpo 2_112_K.

10 EXEMPLO III

Inibição de Miostatina por Anticorpos Anti-Miostatina Humanos (análise luciferase A204)

Uma análise de gene repórter responsivo de miostatina (vide, Thies, et al., *Growth Factors*, (2001) 18:251-259.) foi usada para avaliar a atividade biológica de miostatina ativa in vitro. Esta análise utiliza um vetor repórter pGL3(CAGA)₁₅ acoplado a luciferase. A seqüência de caixa CAGA (AGCCAGACA) (SEQ ID NO: 101) foi considerada como um elemento TGF- β -responsivo na região de promotor de um gene TGF- β -induzido, PAI-1. (Zawel, et al. *Mol. Cell*, (1998) 1:611-617). Este vetor repórter foi gerado ao inserir 15 cópias de caixas CAGA dentro dos sítios SmaI e XhoI de vetor promotor pGL3 (Promega, Cat. No. E1761). A linha celular de rabdomiosarcoma humano, A204 (Célula ATCC No. HTB-82), foi transfectada de forma transiente com pGL3(CAGA)₁₅ e CMV β -GAL utilizando o reagente de transfecção Fugene 6 (Roche Diagnostics, Cat. No. 1814443). As células transfectadas foram cultivadas em meio 5A de McCoy (Invitrogen, Cat. No. 16600) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de estreptomicina, e 100 μ g/ml de penicilina durante 16 horas. As células foram alteradas para meio de inanição (meio 5A de McCoy com estreptomicina, penicilina, e 1mg/ml de albumina de soro bovino), e então tratadas com miostatina, GDF11, ou activina durante 6 horas a 37°C. A atividade de luciferase foi medida utilizando o sistema de análise de luciferase Dual-light® (Applied Biosystems, Cat. No. T1004). A miostatina ativa o repórter a cerca de 10 dobras

com EC50 em torno de 8ng/ml. GDF11 ativa o repórter na resposta muito similar. A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30 minutos antes da adição às células A204. Como mostrado na Figura 1, os anticorpos anti-miostatina humanos da invenção inibiram a atividade de luciferase estimulada por miostatina nas células A204. Um experimento similar que utiliza GDF11 também foi realizado para estudar as especificidades dos anticorpos da invenção. Os dados são resumidos na Figura 1. A maioria dos anticorpos possui atividade de neutralização muito mais potente contra GDF8 do que GDF11. Os anticorpos monoclonais 1_46_1 e 1_132_1 neutralizam tanto GDF8 como GDF11 com a mesma potência.

EXEMPLO IV

Inibição de Miostatina por Anticorpos Anti-miostatina Humanos (análise beta-lactamase L6)

Em análises *in vitro* para medir a ligação de miostatina a receptores de membrana Tipo II na presença de anticorpos anti-miostatina foram realizadas para determinar se os anticorpos anti-miostatina eram capazes de inibir tal ligação e seu grau de inibição.

Uma análise de repórter L6 Aurora foi realizada para avaliar a atividade biológica de miostatina ativa *in vitro*. A LD10 miostatina L6 é uma linha celular que expressa de forma estável um gene repórter de beta-lactamase. A região de promotor no repórter inserido consiste em 16 cópias de elemento de ligação Smad (SBE, GTCTAGAC (SEQ ID NO: 102), Zawel et al., Mol. Cell 1: 611-17 (1998)). As células foram cultivadas em DMEM de alta glicose (Invitrogen, Cat. No. 11995) suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS), 200-400µg/ml de Zeocina, 100 U/ml de estreptomicina e 100µg/ml de penicilina. As células foram semeadas em placa de 96 cavidades no primeiro dia e alteradas para meio de inanição (DMEM com Zeocina, estreptomicina, penicilina e 0,1% de FBS) na tarde do segundo dia. Na manhã do terceiro dia, as células foram tratadas com miostatina, GDF11, ou activina durante 4 horas a 37°C. O kit de carregamento Aurora CCF2 foi usado para analisar a atividade de beta-lactamase de acor-

do com a sugestão do fabricante (Invitrogen, Cat. No. K1032).

A expressão mediada por smad ativada por miostatina do repórter a cerca de 2 a 3 dobras com EC50 em torno de 5ng/ml. GDF11 e activina ativaram o repórter na resposta muito similar.

- 5 A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30 minutos antes da adição às células LD10 de miostatina L6. Como mostrado nas Figuras 2 e 11, todos os anticorpos anti-miostatina humanos testados inibiram a ativação de proteína smad em uma faixa de cerca de 1 a cerca de 225 nM.

10 EXEMPLO V

Inibição de Fosforilação Smad 2 induzida por Miostatina (Western Blot)

- As células do carcinoma hepatocelular HepG2 humanas (ATTC Cell No. HB-8065) foram cultivadas em DMEM de alta glicose (Invitrogen, Cat. No. 11995) suplementadas com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/ml de estreptomicina, e 100µg/ml de penicilina. 60 a 70% de células con-
- 15 fluentes foram alteradas para o meio de inanição (DMEM com estreptomicina, penicilina, e 0,5% de FBS) durante a noite. As células foram tratadas com miostatina durante 30 minutos. A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30
- 20 minutos antes da adição às células HepG2. As células foram lisadas por western blot. Smad2 fosforilado foi detectado utilizando um anticorpo anti-fosfo-Smad2 de coelho (Cell Signalling, Cat. No. 3101), que foi então detectado por Alex 680 Anti-coelho (Molecular Probes, Cat. No. A21076). A quantidade de Smad fosforilado Smad2 foi quantificada utilizando Odyssey Infra-
- 25 red Imager (Li-Cor). A desidrogenase de gliseraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi usada para normalização. Como mostrado na Figura 3, todos os anticorpos anti-miostatina humanos de neutralização testados inibiram a fosforilação de smad 2.

EXEMPLO VI

30 Expressão Aumentada de *myf5* por Anticorpos Anti-Miostatina Humanos

Os mioblastos C2C12 (ATCC Cell No. CRL-1772) foram cultivados em DMEM de alta glicose (Invitrogen, Cat. No. 11995) suplementados

co 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/ml de estreptomicina e 100µg/ml de penicilina. As células foram tratadas com 300ng/ml de miostatina durante 2 horas. A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30 minutos antes da adição às células C2C12. As células foram colhidas e o RNA purificado utilizando kit miniprep RNeasy (Qiagen Cat. No. 74104). O RNA purificado foi quantificado com Kit de Quantificação de RNA RiboGreen® (Molecular Probes, Cat. No. R11490). Uma quantidade igual de RNA total foi usada para análise de PCR em tempo real para detectar a expressão de RNA *myf5*. Os conjuntos de iniciador/sonda para detecção de RNA *myf5* de camundongo foram adquiridos a partir de produtos de expressão genética Assays-On-Demand® (Applied Biosystems, Cat. No. Hs00271574_m1). As condições de análise usadas estavam de acordo com as recomendações do fabricante. RT-PCR de uma etapa foi conduzida sobre o sistema de detecção de sequência ABI7900 (Applied Biosystems). Como mostrado na Figura 4, os anticorpos anti-miostatina humanos de neutralização da invenção aumentaram a expressão de *myf5*. Um anticorpo anti-miostatina humano de não-neutralização, 1_159_1, não aumenta a expressão de *myf5*.

EXEMPLO VII

20 Aumento de Diferenciação Celular por Anticorpos Anti-Miostatina Humanos

A capacidade de anticorpos inibir a inibição mediada por miostatina de diferenciação de mioblasto foi avaliada em mioblastos C2C12. As células C2C12 foram semeadas em placas de 96 cavidades em 25.000 células/cavidade em 200 µl de DMEM/20% de FBS/Penn-Strep. Vinte e quatro horas depois, o meio foi aspirado, as células enxaguadas 1X com meio HIT (DMEM/2% de soro de cavalo/Penn-Strep), e 200 µl de meio HIT sozinho ou suplementado com 300 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems) sozinho ou com diversas concentrações de anticorpo adicionadas. Quarenta e oito horas depois, o meio foi aspirado e as células lisadas em 100 µl de tampão liso (25 mM de Tris pH 7,5, 3 mM de EDTA, 1% de NP-40, 1% de Desoxicolato, 0,1% de SDS e 1 comprimido de inibidor de protease Roche Complete/25 ml de tampão liso). Os níveis embrionários de cadeia pesada de miosina (MHC)

nos lisatos foram determinados por localização 5 µl de lisato em cavidades individuais de placas High Bind MA6000 (MSD Nº P11XB-1, Meso Scale Discovery, MSD), secagem a ar durante 1 hora, adição de 100 µl de Blocker A (MSD Nº R93BA-2), incubação durante 1 hora a 25°C com agitação, lavagem 4X com PBS/0,05% de Tween-20, adição de 50 µl de anticorpo MHC embriônico (meio condicionado de hibridoma ATCC Nº CRL-2039), incubação durante 1,5 hora a 25°C com agitação, lavagem 4X como antes, adição de 50 µl de IgG Anti-Camundongo Sulfo-TAG (MSD Nº R32AC) que foi diluído 1:1000 no diluente de anticorpo (MSD Nº R50AA-2), incubação durante 1,5 hora a 25°C com agitação, lavagem 4X como antes, adição de 150 µl 1X de Tampão Pronto (MSD Nº R92TC-2) e análise de quimiluminescência em um Sector Imager 6000 (MSD). Como mostrado na Figura 5, os anticorpos anti-miostatina humanos de neutralização reverteram diferenciação muscular bloqueada por miostatina na análise MHC.

15 EXEMPLO VIII

Ligação Peptídica de Miostatina

Onze peptídeos foram gerados de GDF8 maduro para testar e localizar a ligação de anticorpo (Vide Figura 6). ELISA de peptídeo foi feita sobre placas ELISA revestidas por glutaraldeído e sobre placas ELISA não-revestidas (superfície NUNC-Immuno® plate MaxiSorp®, Nalge Nunc International, Cat. No. 439454). As placas revestidas por glutaraldeído foram preparadas ao misturar 250 µl de glutaraldeído (50% peso/v) com 50 ml de água deionizada e adicionar 200µl da solução em cada cavidade. As placas foram incubadas durante pelo menos 1 hora em temperatura ambiente. O glutaraldeído foi agitado fora da placa e despedaçado na parte superior de toalhas de papel para remover todo o líquido antes do uso.

As placas ELISA foram revestidas com peptídeo a 1,0µg/cavidade/50µl (em tampão de bicarbonato de sódio, pH 9,6) durante pelo menos 4 horas, e então bloqueadas com 200µl de bloqueador (1% de BSA, 1% de Etanolamina pH 7,4) durante um mínimo de 4 horas. As placas foram lavadas com PBST três vezes com 200 µl/cavidade. 50µl de amostra de anticorpo (1µg/ml em PBST, Salina tamponada com fosfato (PBS) com

0,05% de Tween-20) foram adicionados aos cavidades durante 1 hora. As placas foram então lavadas com PBST três vezes. 50 µl de peroxidase de raiz-forte de IgG anti-humano (HRP) (Pierce, Cat Nº 31420) diluídos em PBST são adicionados durante mais uma hora. As cavidades foram lavadas novamente com TBST três vezes, e então com água deionizada duas vezes. 50 µl de ABTS (MOSS) foram adicionados durante 5 a 20 minutos, e o sinal foi detectado a 405 nm em uma leitora de placa colorimétrica. Os resultados do experimento de ligação são mostrados na Figura 6. Os onze peptídeos são mostrados na Figura 7.

10 EXEMPLP IX

Estudos de Mapeamento de Epitopo

Os experimentos de concorrência cruzada foram realizados utilizando o instrumento BIACORE® 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J), seguindo os protocolos do fabricante.

15 Os experimentos foram realizados em um instrumento BIACORE® 3000 a 25°C em 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de Tween-20. A miostatina foi imobilizada sobre um chip CM5 (Biacore®) utilizando procedimentos de acoplamento de amina padrão que produzem aproximadamente 1300 RU (unidades de ressonância). As amostras de anticorpo foram preparadas a 50 nM e injetadas em pares, por exemplo, um mAb de referência foi injetado durante 10 minutos imediatamente seguido por uma injeção de 10 minutos de um mAb de teste. A superfície foi regenerada e as injeções foram repetidas em ordem inversa. O procedimento foi repetido para todos os pares possíveis de anticorpos. Uma comparação cruzada da resposta total obtida de um par de anticorpos com aquela obtida por injeções em duplicata de cada anticorpo individual foi usada para encontrar anticorpos que se ligam uma ao outro de ligação competitiva, por exemplo, os anticorpos concorrem para a ligação ao antígeno. Uma resposta maior do que aquela observada em ambas injeções em duplicata foi indicativa de ligação a epitopos diferentes se uma resposta intermediária àquela observada nas injeções duplicatas for indicativa de ligação aos mesmos epitopos, de superposição ou adjacentes. Os resultados deste experi-

mento são mostrados na Figura 8 e resumidos na Figura 13.

EXEMPLO X

Imunoprecipitação de miostatina de meio de cultura celular

Um estudo de imunoprecipitação foi realizado para testar a ligação de anticorpos de miostatina a GDF8 madura/complexo de pró-peptídeo. As células 293T foram transfectadas com construção de expressão GDF-8. O meio condicionado foi colhido 7 dias após a transfecção, este continha GDF8 madura e complexo latente. 100 µl de meio condicionado foram incubados com 10 µg de anticorpos de miostatina durante 16 horas a 4°C. Dynabeads de Proteína A (Dyna, Norway) foram adicionados e incubados durante 90 minutos a 4°C. O imunoprecipitado foi coletado utilizando concentrador magnético MPC-E (Dyna, Norway), e lavado quatro vezes com PBS. O imunoprecipitado foi ressuspensão no tampão de amostra de redução e carregado sobre 4 a 12% de gel Bis-Tris NuPage (Invitrogen). A análise de Western blotting foi realizada utilizando sistema de imagem infravermelha Odyssey (Li-Cor). GDF8 madura e GDF8 não-processada foram detectadas utilizando anticorpo anti-miostatina de cabra (R&D systems, Cat Nº AF788). O anticorpo policlonal anti-propeptídeo de coelho (feito em casa) foi usado para detectar tanto pró-peptídeo como GDF8 não-processada. Como mostrado na Figura 9, os anticorpos 2_112_1, 2_43_1, e 2_177_1 imunoprecipitaram GDF8 madura, GDF8 madura/complexo de pró-peptídeo e GDF8 não-processada; o anticorpo 1_66_1 imunoprecipitou GDF8 madura e GDF8 madura/complexo de pró-peptídeo. Nenhum outro anticorpo imunoprecipitou GDF8 madura, pró-peptídeo, ou GDF8 não-processada. Viela 4 é o controle de carregamento de meio 1/10, e viela 7 é o controle de imunoprecipitação apenas com meio.

EXEMPLO XI

Imunoprecipitação de miostatina de soro de camundongo

Um estudo de imunoprecipitação foi realizado para testar a ligação de anticorpos de miostatina a GDF8 madura de soro de camundongo. 200 µl de soro de camundongo (Rockland, Cat Nº D208-00) foram incubados com 20 µg de anticorpos de miostatina durante 16 horas a 4°C. Dynabeads de Proteí-

na A foram adicionados e incubados durante 90 minutos a 4°C. O imunoprecipitado foi coletado utilizando concentrador magnético MPC-E (Dyna, Norway), e lavado quatro vezes com PBS. O imunoprecipitado foi ressuspensão no tampão de amostra de redução e carregado sobre 4 a 12% de gel Bis-Tris NuPage (Invitrogen). A análise de Western blotting foi realizada utilizando sistema de imagem infravermelha Odyssey (Li-Cor). GDF8 madura foi detectada utilizando anticorpo anti-miostatina de cabra biotinizado (R&D systems, Cat Nº BAF788). Como mostrado na Figura 10, os anticorpos 2_112_1, 2_43_1, e 2_177_1 imunoprecipitaram GDF8 madura do soro de camundongo, se 1_116_1 e 1_66_1 não puderem. Sabe-se que GDF8 madura no soro se liga a muitas proteínas inibidoras tais como pró-peptídeo, FLRG, e GASAP1 (Hill et al. (2002) "The miostatina propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of miostatina in normal serum". J. Biol. Chem. 277: 40735-40741. Hill et al. (2003) "Regulation of miostatina in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains". Mol. Endocrin. 17(6): 1144-1154). Este experimento indica que os anticorpos 2_112_1, 2_43_1, e 2_177_1 são de fato anticorpos de neutralização não-competitivos, ou seja, os anticorpos neutralizam miostatina, porém não bloqueiam a ligação de proteínas de ligação inibidoras presentes no soro. Tais anticorpos de neutralização não-competitivos poderiam ser vantajosos in vivo.

EXEMPLO XII

Comparação de anticorpos anti-miostatina in vivo

Camundongos KKA^y/a com cinco semanas (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine)) foram tratados com 10 mg/kg de anticorpos monoclonais 2_43_1, 2_177_1, e 2_112_K ou veículo (PBS) administrados de forma subcutânea uma vez por semana durante cinco semanas. No final do estudo os animais foram submetidos à eutanásia e os grupos de músculos gastrocnemius-plantaris-soleus (GPS), tibiais anteriores (TA) e quadríceps (Quads) foram dissecados e pesados. O tratamento com o anticorpo 2_112_k aumentou significativamente ($p < 0,05$) a massa muscular absoluta do GPS (+15,5%) e Quads (+30,6%). O anticorpo 2_177 aumentou significa-

tivamente apenas Quads (+11,5%). Embora TA tenham aumentado após o tratamento com anticorpo 2_112_K (+16,8%), o aumento não foi estatisticamente significativo ($p=0,330$). O peso de corpo aumentou durante 5 semanas, porém não foi significativamente diferente entre grupos de tratamento em qualquer ponto de tempo durante o estudo. Quando a massa muscular for corrigida para peso de corpo (o índice de massa muscular), ocorreram diferenças significativas apenas com tratamento de 2_112_K (+11,4% em GPS e +20,6% em Quads). Os resultados deste experimento são mostrados nas Figuras 14 e 15.

10 EXEMPLO XIII

Farmacologia in vivo e eficácia de anticorpo

A farmacologia in vivo e eficácia de anticorpo 2_112_K foram avaliados em camundongos. Para evitar a imunomodulação potencial devido a uma resposta de anticorpo anti-humano de camundongo (MAHA), estudos in vivo foram realizados em camundongos beges imunodeficientes combinados com imunodeficientes graves (Imunodeficiência Combinada Severa) (SCID). A administração subcutânea de anticorpo 2_112_K naqueles camundongos em 10 mg/kg/semana s.c. durante 5 semanas aumentou a massa de músculo esquelético em 19 a 25% e a resistência muscular em cerca de 15%. O prolongamento da duração deste tratamento para 10 semanas resultou em um aumento adicional em resistência muscular para 21%, porém nenhum aumento adicional em massa muscular (em 18 a 27%). Também, a Dose de 50 mg/kg/semana s.c. durante 10 semanas não produziu aumentos superiores em massa ou resistência muscular comparados com 10 mg/kg/semana. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 16.

EXEMPLO XIV

Efeitos de dose e resposta de concentração

Quando administradas de forma subcutânea em camundongos SCID em doses que variam de sem efeito a dose máxima possível (0,01, 0,1, 1 e 10 mg/kg/semana), anticorpo 2_112_K aumentou a massa muscular esquelética de forma dependente de dose em cerca de 0%, 3%, 7% e 28%,

respectivamente, após 5 semanas (Figura 17). O prolongamento da duração de tratamento para 10 semanas não resultou em nenhum aumento adicional em massa muscular, porém tem a tendência a aumentar a resistência de músculo tibial de forma marginal por um adicional de 5%. Também, o anti-
 5 corpo dependente de dose alterou a composição de gordura de corpo destes camundongos em +10%, +1%, -10%, -22% com relação a controle de PBS em 0,01, 0,1, 1,0 e 10 mg/kg/semana durante 5 semanas.

A análise não-linear, de quatro parâmetros dos dados de resposta de dose e concentração produziu valores ED50 e EC50 estimados de 3,6
 10 mg/kg/semana e 20,4 mg/mL (~136 nM), respectivamente, adotando o aumento em massa muscular obtido com a dose de 10 mg/kg/semana que será de máxima eficácia. A relação entre a concentração de dose ou soro de anti-corpo 2_112_K versus alterações na massa muscular são mostradas na Figura 18.

15 EXEMPLO XV

Eficácia de anticorpo para atenuação de atrofia muscular

Camundongos KK com dez semanas (JAX laboratories, Bar Harbor, Maine) foram randomizados em três grupos: placebo/veículo, cortisona/veículo, e cortisona/anticorpo 2_112_K. Os camundongos foram dosados de forma subcutânea tanto com veículo (PBS) como 10 mg/kg de anti-
 20 corpo 2_112_K durante cinco semanas seguido por implante de um pélete de placebo ou cortisona. Cinco dias depois, os camundongos foram submetidos à eutanásia, sacrificados e a massa muscular e massa de placa de gordura foram avaliadas. Para avaliar a massa muscular, os grupos de músculos gastrocnemius-plantaris-soleus (GPS), tibiais anteriores (TA) e quadríceps (quads) foram dissecados e pesados. O implante de cortisona resultou em uma redução significativa ($p < 0,05$) em massa muscular para $85,1 \pm 2,2\%$ (GPS), $85,5 \pm 3,9\%$ (TA) e $84,1 \pm 3,7\%$ (quads) do nível de placebo/veículo. O tratamento com anticorpo 2_112_K melhorou completamente o desperdício
 25 induzido por cortisona de nível de placebo/veículo de GPS ($102,0 \pm 2,2\%$), TA ($99,5 \pm 3,6$) e quads ($104,6 \pm 2,8\%$). Os valores eram similares quando normalizados por grama de peso do corpo. Para testar se este efeito era es-

pecífico para massa muscular, a massa de placa de gordura foi determinada. Para massa de placa de gordura, as placas de gordura inguinais, epididimais e abdominais foram dissecadas e pesadas. O tratamento com anticorpo 2_112-K não evitou significativamente ($p < 0,05$) a perda na massa de placa de gordura devido ao implante de cortisona em placas de gordura inguinais, (cortisona/veículo ($75,1 \pm 4,7\%$) e cortisona/2_112_K, ($82,3 \pm 5,3\%$)), epididimais (cortisona/veículo ($79,3 \pm 5,0\%$) e cortisona/2_112_K ($87,1 \pm 3,9\%$)), ou abdominais, (cortisona/veículo ($79,5 \pm 5,5\%$) e cortisona/2_112_K ($82,2 \pm 4,2\%$)). Os valores foram expressos com relação à placa de gordura de placebo/veículo. Os resultados deste experimento são mostrados nas Figuras 20A e 20B.

EXEMPLO XVI

Purificação de Proteína A de Anticorpo de Miostatina

1 a 2 litros de meio concentrado (10 dobras) HEK293 foi filtrado (2 microns) e carregado sobre uma coluna de proteína A equilibrada (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (53 mLs, equilibrados com 5 volumes de coluna de D-PBS, pH 7,0) em 2 mL/min. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão acetato (20 mM de acetato de sódio, pH 5,5) e a proteína eluída com 4 volumes de coluna de pH 3,2 a 3,5 de acetato de sódio (20 mM). O pH do eluato foi ajustado para pH 5,5 com hidróxido de sódio e filtrado, se necessário. Por fim, o material foi concentrado a 10 mg/mL, dialisado em 140mM de cloreto de sódio, 20 mM de acetato de sódio, pH 5,5, filtrado e armazenado a 4 graus C.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descritivo estão incorporados aqui à guisa de referência como se cada publicação individual ou pedido de patente estivesse indicado de forma específica e individual para ser incorporado à guisa de referência. Embora a invenção anterior seja descrita em alguns detalhes à guisa de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de compreensão, será facilmente avaliado pelo versado na técnica, em consideração com as instruções desta invenção, que certas alterações e modificações podem ser feitas neste sem que se abandone o espírito ou escopo das reivindicações em anexo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> PFIZER, INC.
AMGEN FREMONT INC.

<120> ANTIBODIES TO MYOSTATIN

<130> ABX-PF7 PCT

<140>

<141>

<150> 60/674,933

<151> 2005-04-25

<160> 122

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caocttcagt agctatagca tgaattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaaaga ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
gggtacagct atgggtcttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgcctgtgt ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtctgct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcggtgcac accttcccag ctgtcctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcaccac gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aacccaagga caacctcatg atctcccga cccctgaggt cagctgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcacggttgt gacccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc ccattcccgg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accaacctc ccattgctga ctccgacggt 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct cgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga
1338

```

<210> 2

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gacatccaga tgacccagtc tccatctctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctcagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Ala
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Arg Leu Ile
 35 40 45

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

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

<400> 5
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atcactgtgc gagaaatacg 300
 gtgggaagtg ggtactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggctcacc 360
 gtctcctcag cctccacca gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaacoggtg 480
 acgggtgctg ggaactcagg cgctctgacc agcggcggtg acaccttccc agctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag caacttcggc 600
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt gccaggaccg 720
 tcagttctc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactgggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
 acgttcctg tggtcagcgt cctcacogtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaac catctccaaa 1020

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

<210> 6

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Lys

<210> 7

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gcgggctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agtcaggga gtctccacag ctctgatcc atttgggttc taatcgggccc 180
 tccggggctc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgagg aggtgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagttct acaaaactccg 300
 ctcaactttcg gcggaggga caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcactcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgcctccaa 480

tgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgogaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgcgc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 8
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile His Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Val
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cggccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccggaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 300
ggatacagct atggatttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagtcacaa gccagcaac acaaagggtg acaagacagt tgagcgcaa 660
tgttgtgtcg agtgcaccac gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 720
tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cactgctgtg 780
gtggtggagc tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccattcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaatga 1338

```

<210> 10

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100                      105                      110

```

```

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

```


Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

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

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

<400> 11
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgccg gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataantagtt accctcggac gttcgggocaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaatgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gogaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgcoaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg 300
ggatactact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcacogt ctctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttcccctg ggcctctgt ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcaca gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcacc accgagca ccacctgtg caggacogtc agtcttctc 720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cactgtcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttcogtgtg 900
gtcagcgtcc tcacogtgtt gcaaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
gtctccaaca aggectccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccctcccggt aggatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agcggagaa caactacaag accacacctc ccctgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcacogtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctcogg gtaaatga                                     1338

```

<210> 14

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

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

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

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

<210> 15

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gacatccaga tgaccocagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
ctcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgctttag gotgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcc gatctatggt gcctccagtt tgcaaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag octgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac ttccggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gotgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactcttat 420
cccagagagg ccaaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc cgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Ala
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 17
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acgactgtgt attactgtgc gagagatcga 300
 ggctacctct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgcctctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggtctgct ggtcaaggac tacttccccg aacoggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtccctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
 acctgcaacg tagatcacia gcccgcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
 tgttgtgtcg agtgcaccac gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 720
 ttccccccaa aaccgaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cactgcgctg 780
 gtggtggagc tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtagct ggaaggcgctg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcgag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccgggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgaggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200

tcctttcttcc tctacagcaa gctcacogtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaatga 1338

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

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

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

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

<210> 19

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gacatocaga tgaccocagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtcg ggccattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcctccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tgggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca goctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccacagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

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

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

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

<400> 21
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgata taccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggccttgagt gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaactat 180

```

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
ctggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaatacg 300
gtgggaactg gatactacta ctacgggatg gacgtctggg gccaaaggac cacggctacc 360
gtctcctcag cctccaccaaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 420
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tggcctccag caacttgggc 600
acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgcaca ccgtgccacg caccacctgt ggcaggaccg 720
tcagtcttcc tcttccccc aaaccccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag 780
gtcacgtgcg tgggtgggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactgggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
accaaagggc agcccgaga accacagggt tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1350

```

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Thr Val Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 210 215 220
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

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

<400> 23
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag gtctgatct atttggtttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
 cccactttcg gccgaggag caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgcctccaa 480
 tcgggttaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaagtccta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgta acaagagat tcaacagggg agagtgttag 660

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

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

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

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

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

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

<400> 25
gagggtgcagc tattggagtc tgggggagggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tccctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggaatg ggtctcaact attagtggta gtgggtggta cacattctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 300
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccttgcct caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tccctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccacatc tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacgtgog tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc cagtcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaaggct tctaccccgag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgagggtc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

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

<400> 26
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe 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 Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

Lys

<210> 27
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaacttag cctggtaacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcaccacca gggccactgg tttcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgaggc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagctc 240
 gaagattttg caatttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcgggggg 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt goctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 26
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccgt 300
 gggagctact tcctctttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggg cttcccccgt ggcctcgt ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag oggogtgac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 600
 acctgcaacg tagatcaca gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
 ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggaag tgagccacga agaccocgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccaagg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccocaggc acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacotc ccatgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaatga

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

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ser Tyr Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

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

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

<400> 31
 gacatgcaga tgacccagtc tccatccctcc ctgtctgcac ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgccct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtac tgggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgctcac ttogggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac coactcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

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

<400> 32

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 33

<211> 1338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caocttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggtctggagt ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 300
 ggatacagct atggtcttga ctactggggc caggggaacc tggtcacctg ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgcctctgt ccaggagcac ctccagagagc 420

```

acagcgcccc tgggctgect ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtectaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tggtgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cagtgcggtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcggtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccattcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgccttgt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttc totacagcaa gctcacgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctctc 1320
ctgtctccgg gtaaata 1338

```

<210> 34

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

<210> 35

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcc gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg cgacttatta ctgtctacag cttaatagtt acccattcac ttctggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

```

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                      5                      10                      15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20                      25                      30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35                      40                      45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115                      120                      125

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

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

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

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

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

```

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

<400> 37
gagggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccctttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagacttcg tgaaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa caccgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 300
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggaacat ggtcacogtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttcccccctg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactcctc cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaaag ccagcaaca ccaagggtga caagagagtt 660
gagtcacaaat atgggtcccc atgcccacac tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
gtggatggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacogtc ctgcaaccag actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct cctgtctctt gggtaaatga 1350

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

<400> 38
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Phe 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 Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 39

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

gaaatagtga tgaagcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agcaatttag cctgggttcca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattccacca gggccactgg tatcccagcc 180
agggttcagt gcagtgggtc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

```

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41

<211> 1350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacctttagc	agctatgcc	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcagct	attagtggt	gtggtggtg	cacattctac	180
gcagactccg	tgacggggcg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240
ctgcaattga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	atcactgtgc	gaaagatgga	300
aggtttaact	ggaactacgg	ggcttctgat	atctggggcc	aagggaacct	ggtcaccgtc	360
tcttcagctt	ccaccaaggg	cccatccgtc	ttcccccctg	cgccctgctc	caggagcacc	420
tccgagagca	cagccgccct	gggttgccctg	gtcaaggact	acttcccoga	accggtgacg	480
gtgtcgtgga	actcagggcg	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag	540
tctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgacogtgc	cctccagcag	cttgggcacg	600
aagacctaca	cctgcaacgt	agatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagagagtt	660
gagtccaaat	atgggtcccc	atgcccacac	tgcccagcac	ctgagttcct	ggggggacca	720
tcagtcttcc	tggtcccccc	aaaacccaag	gacactctca	tgatctcccg	gacccctgag	780
gtcacgtgcg	tggtgggtgga	cgtgagccag	gaagaccccg	aggtccagtt	caactggtac	840
gtggatggcg	tggaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gttcaacagc	900
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	cggcaaggag	960
tacaagtgca	aggtctccaa	caaaggcctc	ccgtcctcca	tcgagaaaac	catctccaaa	1020
gccaaagggc	agccccgaga	gccacaggtg	tacaccctgc	ccccatccca	ggaggagatg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgpc	tcccgctgctg	1200
gactccgaag	gctccttctt	cctctacagc	aggctaaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
gaggggaatg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgacacaacca	ctacacacag	1320
aagagcctct	ccctgtctct	gggtaaatga				1350

<210> 42
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccact ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca ggaccagtca gagtgttagc agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120
 ggccagggtc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaacttca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccaa ctgtcttcat ctcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgtgtgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcaactaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

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

<400> 44
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaattgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaattga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
 gggtagagct atgggtcttga ctactggggc cagggaaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Ala
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 48
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 gacatccaga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgctttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctcagcgct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtatc tgggacagaa ttactctcca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa ac 322

<210> 49
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Thr Val Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 370
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 50

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcogtgt atcactgtgc gagaaatacg 300
gtgggaagtg ggtactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag                                     370

```

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
      20             25             30

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

Pro Gln Leu Leu Ile His Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
      50             55             60

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

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

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100            105            110

```

<210> 52

<211> 337

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtc gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgoaga agtcagggca gtctccacag ctctgatcc atttgggttc taatcgggcc 180
tccggggctc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagttct acaaactccg 300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaac                                     337

```

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 54

<211> 358

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtgcag cctctggatt cactctcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 300
 ggatacagct atggtattga ctactgggac cagggaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Ala
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 56

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgctttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac aoggtgtgtg attactgtgc gagagatagg 300
 ggatactact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcag 358

<210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Ala
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 60
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 ctcaacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgcttttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgccct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac tttcggcct 300
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 61
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ser Tyr Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccgt 300
 gggagctact tcctctttga ctactggggc caggggaacc tggtcacctg ctctctcag 358

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Asp Met Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

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

```
<210> 64
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 64							
gacatgcaga	tgaccacagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60	
atcacttgcc	gggcaagtca	gggcattaga	aatgatttag	gctgggtatca	gcagaaacca	120	
gggaaagccc	ctaagcgcc	gatctatggt	gcatccagtt	tgcaaaagtgg	ggccccatca	180	
agggtctacgc	gcagtggtat	tgggacagaa	ttcactctca	caatcagcag	cctgcagcct	240	
gaagattctg	caacttatta	ctgtctacag	cataatagtt	accgcctcac	tttcggcgga	300	
ggggaaccaag	tggagatcaa	ac				322	

```
<210> 65
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 65
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
  1                      5                      10                      15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
      100                      105                      110

```

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 358
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggto cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acgactgtgt attactgtgc gagagatcga 300
ggctacctct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcag 358

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggcatttag aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgccg gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg ccagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 69
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Thr Val Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 370
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggata taccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttccagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 ctggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaatacg 300
 gtgggaactg gatactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacgggtcac 360
 gtctcctcag 370

<210> 71
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Gln Thr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72

<211> 337

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtea cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtc gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag gtctgactct atttggtttc taatcggggc 180
tcgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
cccactttcg gcggaggagac caaggtggag atcaaac 337

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggatt cacccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt 300
 ggatacagct atggtcttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcttcag 358

<210> 75
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 76
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 gacatccaga tgaccagtc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg cgacttatta ctgtctacag cttaatagtt acccattcac ttccggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 77
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe 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 Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78
 <211> 367
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 gaggtgcagc tattggagtc tgggggagggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgagc cctctggatt caccttttagc agctttgccca tgagctgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtgggta cacattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac aogggcgtat attactgtgc gaaagatgga 300
 aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacogtc 360
 tcttcag 367

<210> 79
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 80

<211> 322

<312> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120
 gggcagggtc ccaggctcct catctatggt gcattccacca gggccactgg tttcccgacc 180
 aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
 gaagattttg caatttatta ctgtcagcag tataataact ggcgctcac tttcggcggg 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 81

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82
<211> 367
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 82
gaggtgcagc tattggagtc tgggggagggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agcttttgcca tgagctgggt ccgcccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtggttag cacatactac 180
gcagacttgc tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 300
aggtataact ggaactacgg ggcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
tcttcag 367

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 84

gaaatagtga tgaagcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtcg agtggttaga agcaatttag cctgggtcca gcagaaacct 120
 gggcaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 85

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Glu Val 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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gly Arg Phe Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Ser Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 86

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt caccttttagc agctatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacattctac 180
 gcagactccg tgacggggcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atcactgtgc gaaagatgga 300
 aggtttaact ggaactacgg ggcttctgat atctggggcc aagggaccat ggtcaccgtc 360
 tcttcag 367

<210> 87
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 88
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccact ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca ggaccagtca gactgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 89
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp 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> 90

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp 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> 91

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (21)

<223> Inosine

<400> 91

caggtgcagc tggagcagtc ngg

<210> 92
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 92
 gctgagggag tagagtcttg agga

24

<210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 93
 tacgtgccaa gcatactcgc

20

<210> 94
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 94
 aggctggaac tgaggagcag gtg

23

<210> 95
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 95
 ccctgagagc atcaymyarm aacc

24

<210> 96
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 96
 hvthtcact yggatgacrg cactg 25

 <210> 97
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 97
 attyrgtgat cagsactgaa casag 25

 <210> 98
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 98
 gsartcagwc ycwvycagga cacagc 26

 <210> 99
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 99
 caccaggkga ttgcatatt rtccc 25

 <210> 100
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 100
 atcaatgcct gkgtcagagc yytg 24

<210> 101
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 101
 agccagaca

9

<210> 102
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 102
 gtctagac

8

<210> 103
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 103
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 104
 Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala
 1 5 10 15

Pro Lys

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 105

Arg	Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu
1				5					10					15	

Gln Lys

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 106

Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	

Gly Pro

<210> 107

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 107

Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn
1				5					10					15	

Gly Lys

<210> 108
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 108
 Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys
 1 5 10 15

Gly Cys Ser

<210> 109
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 109
 His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
 1 5 10 15

Glu Ala

<210> 110
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 110
 Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr
 1 5 10 15

Cys Ser

<210> 111
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 111

Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu
1					5				10					15	

Val His

<210> 112

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 112

Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys
1				5					10					15	

Met Ser

<210> 113

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 113

Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly
1				5					10					15	

Lys Ile

<210> 114

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 114

gaggtgcagc	tgttggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttttagc	agctttgcca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	ggctggaatg	ggctcgaact	attagtggta	gtgggtggta	cacattctac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaaagatgga	300
aggtataact	ggaactacgg	ggcttttgat	atctggggcc	aagggacaat	ggtcaccgtc	360

```

tcttcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgcctgtctc caggagcacc 420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtgacg 480
gtgtcgtgga actcagggcg tctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccggc tgtcctacag 540
tcttcaggac tctactccct cagcagcgta gtgacogtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 660
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cactgtggc aggaccgtca 720
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctccccggac cctgaggtc 780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcag 900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgcagg tctccaacaa aggcctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaaacc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gcgggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1200
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctccacgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1347

```

<210> 115
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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 Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe 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 Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

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

<210> 116

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 116

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaacttag cctggtaacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcacccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagag ttcaacttca ccatcagcag cctgcagctc 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtag 645

<210> 117

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118
Glu Val 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 Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Phe 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 Lys Asp Gly Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 367
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 119
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtggtgggta cacattctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatgga 300
aggtataact ggaactacgg ggtttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacccgc 360
tcctcag 367

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

<210> 121

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 121

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccacagcag cctgcagctc 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcogctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano, quimérico ou humanizado ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente à miostatina, em que o dito anticorpo ou parte se liga seletivamente a miostatina sobre GDF11 por pelo menos 50 dobras, e em que o dito anticorpo ou parte inibe a ligação de miostatina a um receptor de activina tipo I ou tipo II.

2. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste que possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

10 (a) competir pela ligação a miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; e

15 (b) se ligar ao mesmo epitopo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

3. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste que compreende:

25 (a) um conjunto CDR, CDR1, CDR2 e CDR3, que de forma seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs, CDR1, CDR2, e CDR3 de cadeia pesada, de forma seqüencial juntamente, que estão incluídas na seqüência de aminoácido estabelecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 e 118;

30 (b) um conjunto de CDR, CDR1, CDR2 e CDR3, que de forma seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs, CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de forma seqüencial

juntamente, que estão incluídas na sequência de aminoácido estabelecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 83, 87 e 120; ou

(c) um primeiro conjunto de CDR de (a) e um segundo conjunto de CDR de (b).

4. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente a miostatina, em que:

(a) a cadeia pesada compreende as seqüências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) a cadeia leve compreende as seqüências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; ou

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b).

5. Anticorpo monoclonal selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

(c) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido

estabelecidas na SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

(e) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20;

5 (f) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

(g) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

(h) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

10 (i) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

(j) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e

15 (l) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

6. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste selecionado a partir do grupo que consiste em:

20 (a) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ
25 ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

(c) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ
30 ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

(e) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende

de as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 20;

(f) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

(g) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

(h) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

(i) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

(j) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e

(l) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

7. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno do mesmo que compreende um primeiro conjunto de seqüência CDR que compreende um primeiro conjunto CDR1, primeiro CDR2 e primeiro e primeiro CDR3 e um segundo conjunto de seqüência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo, em que cada dito primeiro conjunto CDR e o dito segundo conjunto CDR de forma seqüencial juntamente possuem pelo menos 90% de identidade com as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de:

(a) SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente;

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

8. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno do mesmo que compreende um primeiro conjunto de seqüência CDR que compreende um primeiro CDR1, primeiro CDR2 e primeiro CDR3 e um segundo
 15 conjunto de seqüência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo CDR3, em que onde cada dito primeiro conjunto CDR e dito segundo conjunto são as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de:

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

9. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente a miostatina que compreende a seqüência de aminoácido de cadeia pesada estabele-

cida em SEQ ID NO:115 e a seqüência de aminoácido de cadeia leve estabelecida em SEQ ID NO:117.

10. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo que compreende as regiões variáveis contidas em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

11. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, que se liga especificamente a miostatina que compreende CDRs CDR1, CDR2, e CDR3 contidas em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

12. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, sendo que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno se liga às partes de peptídeo 1 e peptídeo 5 de miostatina, em que o peptídeo 1 compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 103 e peptídeo 5 compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 107.

13. Anticorpo produzido por uma célula que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

14. Composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Método que compreende a etapa de administrar em um indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 ou a composição farmacêutica como definida na reivindicação 14, em que o dito anticorpo, parte de ligação de antígeno ou composição farmacêutica inibe a atividade de miostatina, em que o dito indivíduo está necessitado de aumento de massa muscular, promoção de desenvolvimento de músculo esquelético, tratamento de um distúrbio de atrofia muscular ou aumento de crescimento de músculo esquelético.

16. Linha celular isolada que produz um anticorpo ou uma parte de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 ou a cadeia pesada ou cadeia leve do dito anticorpo ou ou dita parte de ligação de antígeno.

17. Molécula de ácido nucléico isolada que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação de antígeno da mesma ou a cadeia leve ou uma parte de ligação de antígeno da mesma de um anticorpo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13.

18. Método que compreende administrar em um indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina, em que o dito indivíduo está necessitado de aperfeiçoamento de homeostase da glicose, redução de massa de gordura, aumento da sensibilidade à insulina, aperfeiçoamento de função de rim, redução de acúmulo de gordura, tratamento, prevenção ou inibição de uma doença ou condição é caracterizada por perda óssea, sendo que a dita doença ou condição inclui osteoporose, osteopenia, osteoartrite e fraturas ósseas, tratamento de síndrome metabólica, ou neutralização de atrofia muscular a partir de administração prolongada de um glicocorticóide ou um hormônio esteróide durante o tempo em que o indivíduo está submetido ao tratamento com um glicocorticóide ou um hormônio esteróide.

19. Método para reduzir a atividade de miostatina em um indivíduo necessitado do mesmo que compreende administrar no dito indivíduo um anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

20. Método para reverter o declínio relacionado à idade em massa muscular em um indivíduo necessitado do mesmo que compreende administrar no dito indivíduo um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

21. Linha de célula hospedeira de mamífero que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo humano, quimérico ou humanizado que concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, em que o

anticorpo ou parte do mesmo possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) concorrer para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) é um anticorpo que possui a mesma sequência de aminoácido que o anticorpo produzido por uma célula de hibridoma que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576; e

(d) é uma linha celular de hibridoma selecionada a partir do grupo que consiste em Números de Designação de Depósito ATCC PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

22. Método para promover o crescimento muscular, ganho de peso ou auxílio na prevenção de fraqueza em gado, suíno, carneiro, frangos, perus, cavalos, peixe, cães e gatos necessitados do mesmo que compreende a etapa de administrar no dito indivíduo um anticorpo ou parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina.

FIG. 1

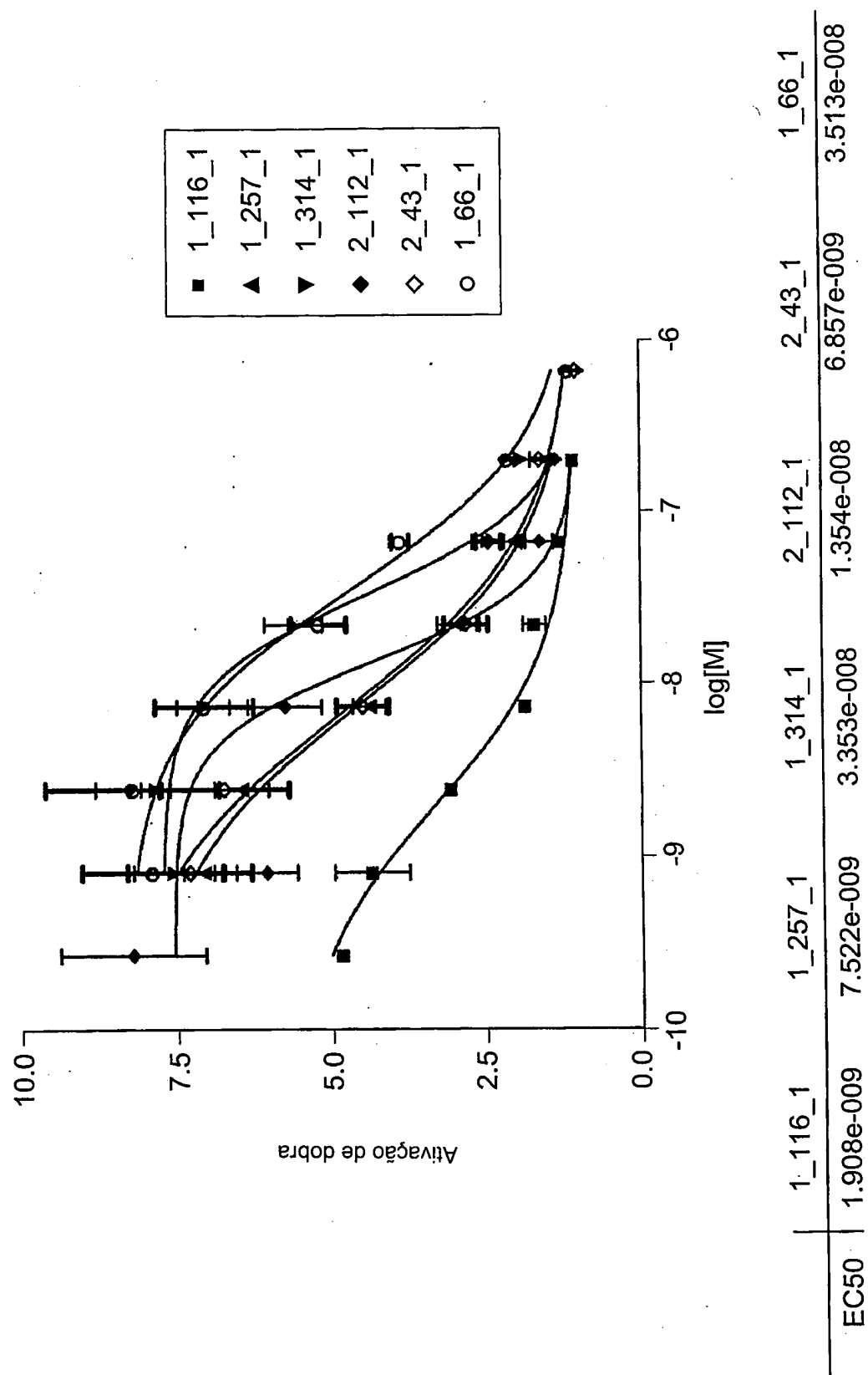
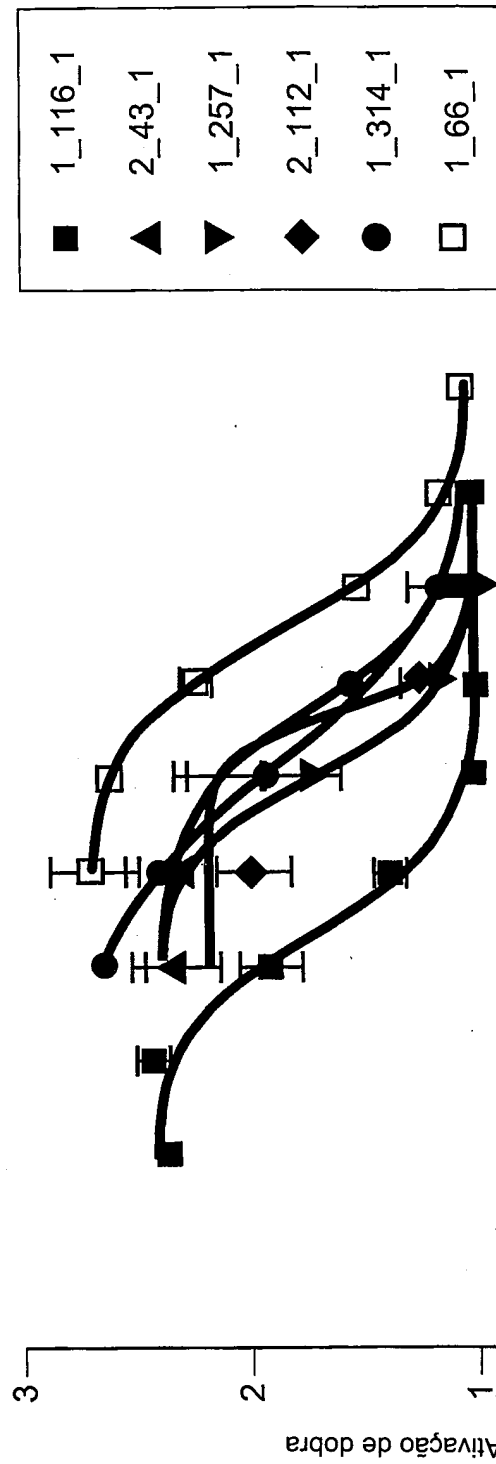


FIG. 2



EC50	1_116_1	2_43_1	1_257_1	2_112_1	1_314_1	1_66_1
	1.216e-009	1.689e-008	7.509e-009	1.604e-008	8.025e-009	3.994e-008

FIG. 3

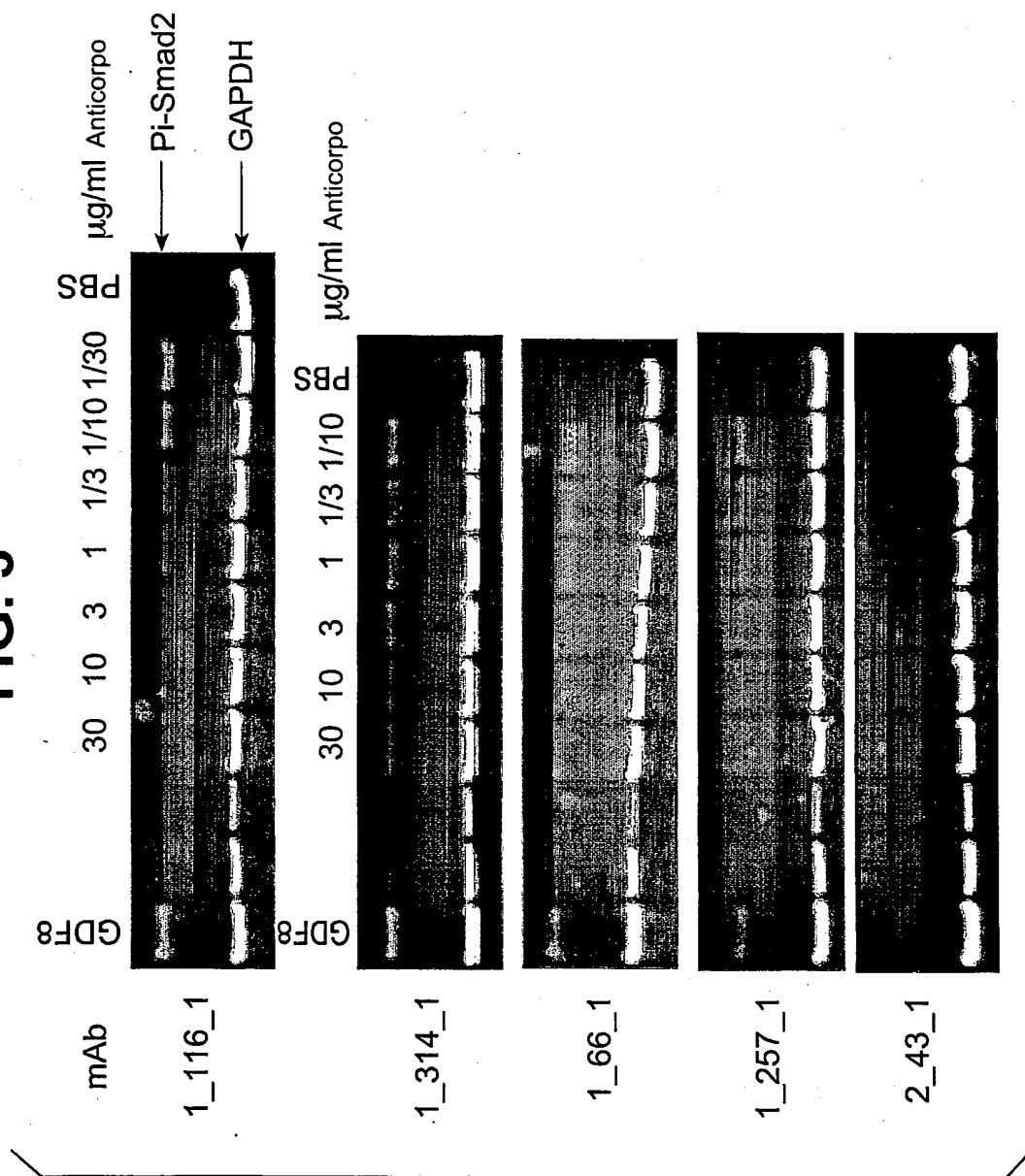


FIG. 4B

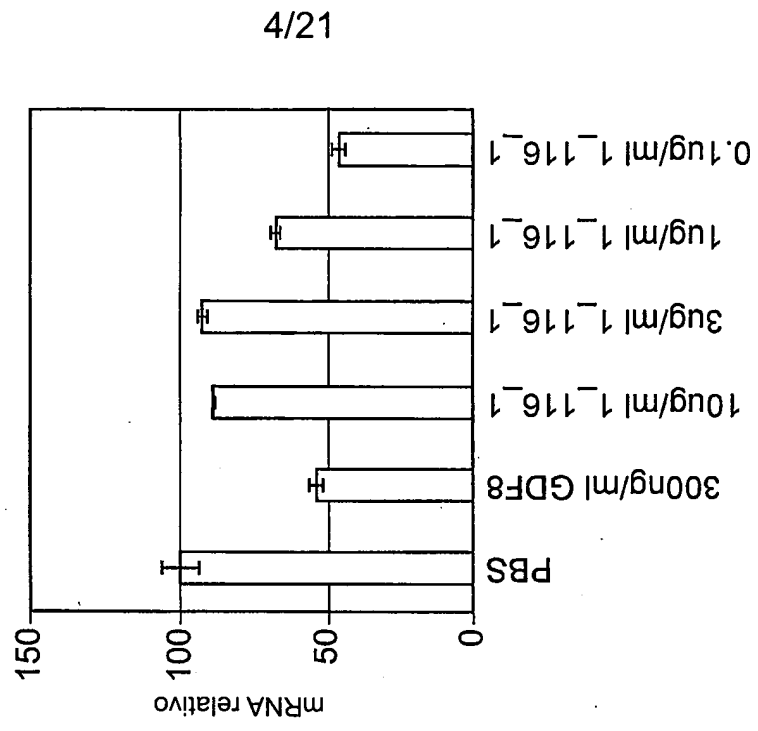


FIG. 4A

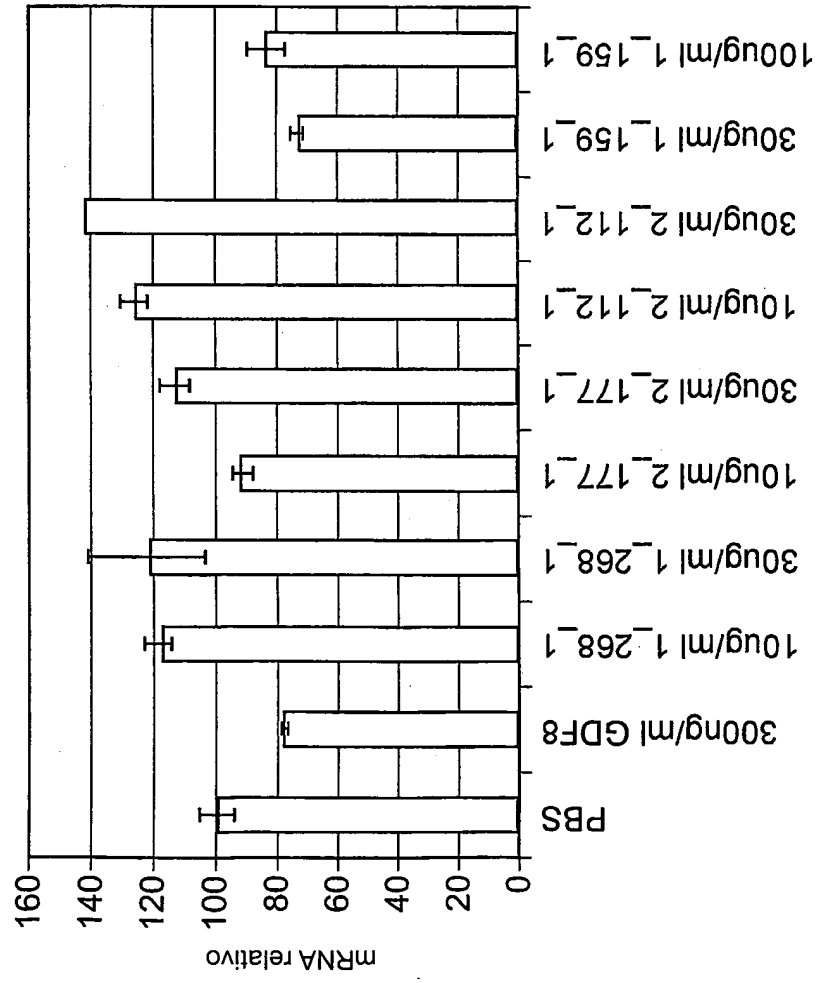


FIG. 5A

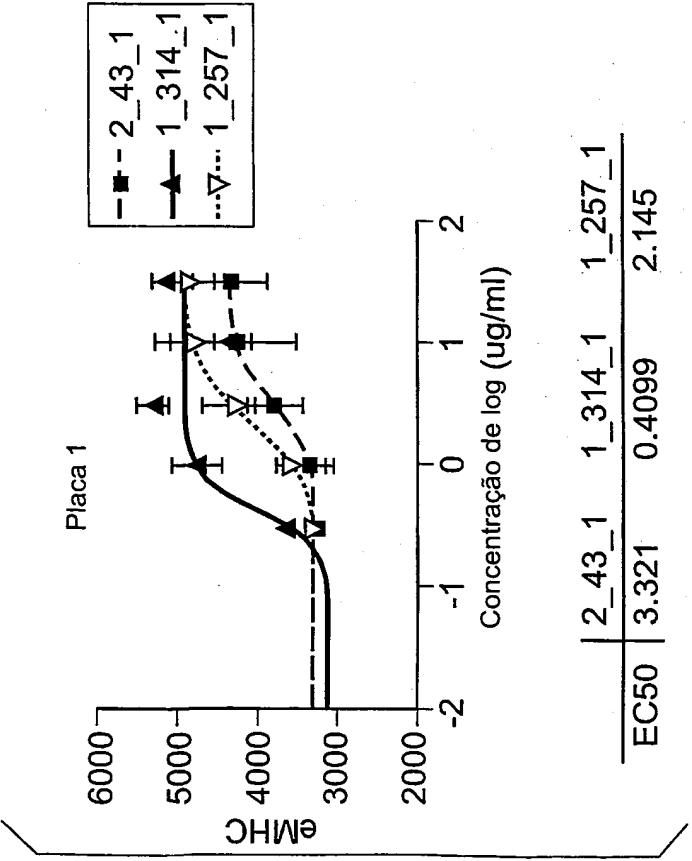


FIG. 5B

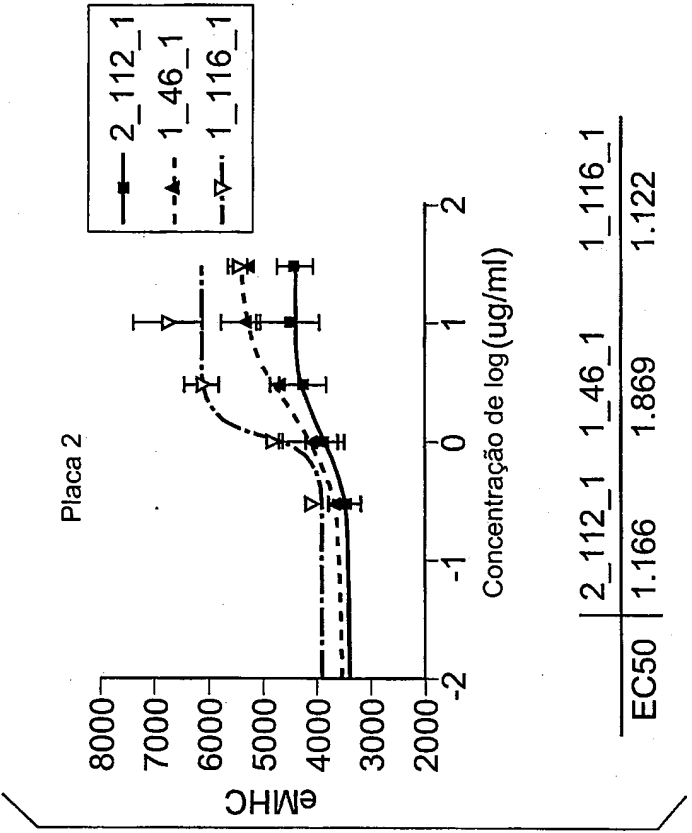
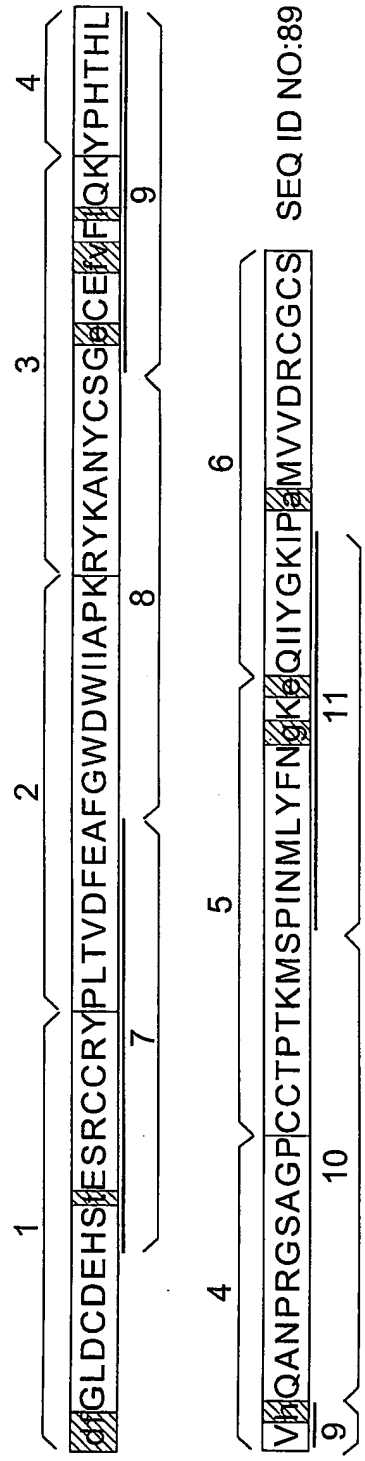


FIG. 6



B

Miostatina mAbs	Ligação peptídica
1_116_1	2
1_132_1	
1_46_1	
1_257_1	2
2_112_1	1,5
2_43_1	1,5
1_136_3	2
1_314_1	
1_66_1	
2_177_1	1,5

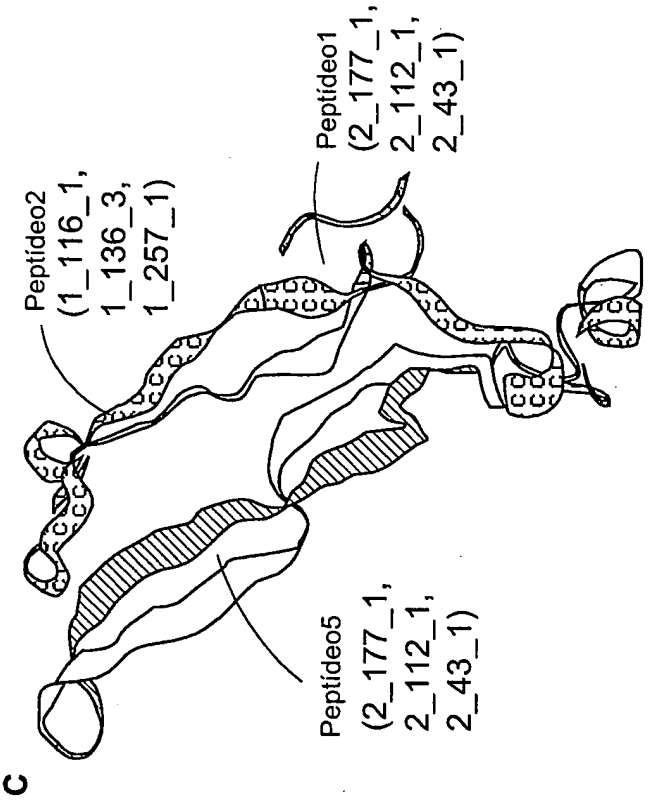


FIG. 7

Número de Peptídeo	Seqüência de aminoácido	SEQ ID NO.
1	DFGLDCDEHSTESRCRY	103
2	PLTVDFEAFGWDWIIAPK	104
3	RYKANYCSGECEVFVFLQK	105
4	YPHTHLVHQANPRGSAGP	106
5	CCTPTKMSPINMLYFNGK	107
6	EQIIYGKIPAMVVDRCGCS	108
7	HSTESRCCRYPLTVDFEA	109
8	FGWDWIIAPKRYKANYCS	110
9	GECEVFVFLQKYPHTHLVH	111
10	QANPRGSAGPCCTPTKMS	112
11	PINMLYFNGKEQIIYGKI	113

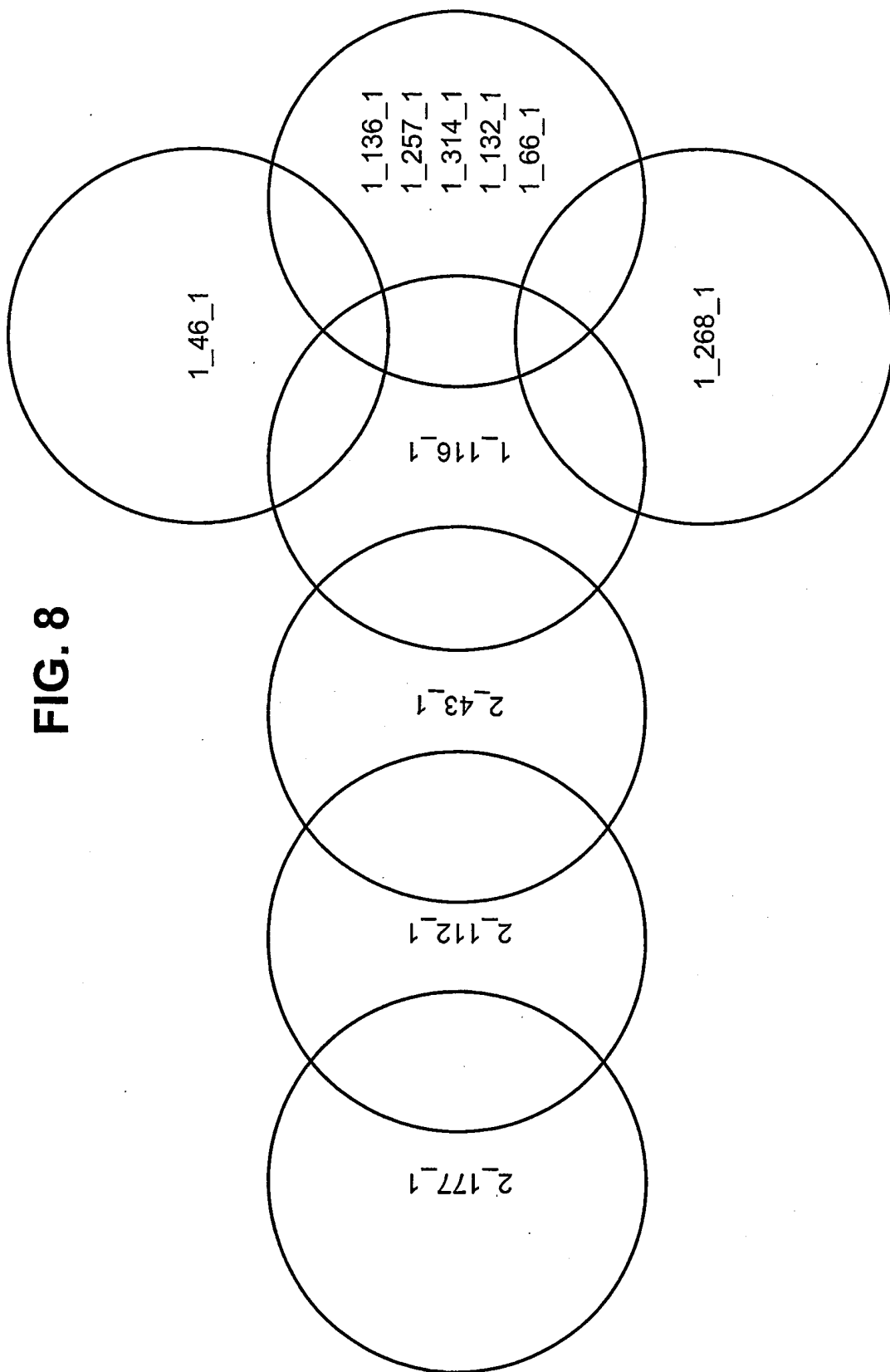


FIG. 8

FIG. 9

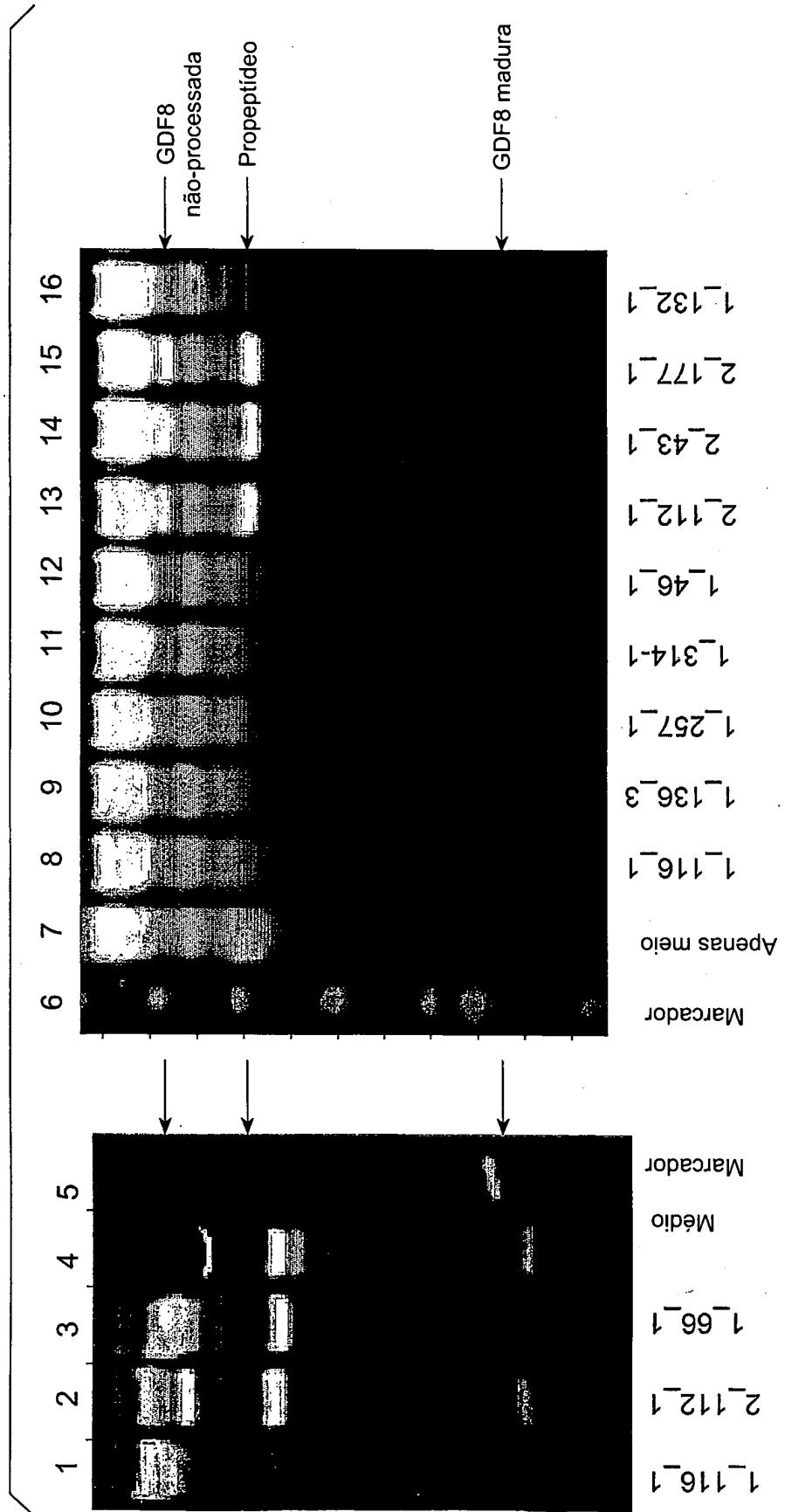


FIG. 12

<u>Clone</u>	<u>A204</u> IC50 (nM)	<u>L6</u> IC50 (nM)	<u>BIAcore</u> KD (pM)	<u>GDF11</u> Atividade (A204)	<u>VH</u>	<u>D</u>	<u>JH</u>	<u>VK</u>	<u>JK</u>
1_116_1	0.83	1.3	12	60% Inibição em 2uM, IC50>=0.7uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK1
1_132_1	1.8	1.7		IC50=2.8nM	1-02	4-23	JH6B	A3	JK4
1_46_1	3.1	8.3	99	IC50=7nM	1-02	4-23	JH6B	A3	JK4
1_257_1	9.3	7.7	160.0	50% Inibição em 4uM IC50~4uM	3-21	5-12	JH6B	A30	JK3
2_112_1	12.3	11.4	11	30% Inibição em 1.3uM IC50>1.3uM	3-23	1-7	JH3B	L2	JK4
2_43_1	13.9	16.9	1500	Não-inibição em 0.7uM	3-23	1-7	JH3B	L2	JK4
1_136_3	14	6.6	43.0	Não-inibição em 0.2uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK1
1_268_1	19	37	240	Não-inibição em 2uM	3-21	1-26	JH4B	A30	JK4
1_314_1	28.5	9.6	110.0	Não-inibição em 2uM	3-21		JH6B	A30	JK1
1_66_1	35.1	41.9	83	40% Inibição em 2uM IC50~2uM	3-21	5-5	JH4B	A30	JK3
2_177_1	40	223	890	Não-inibição em 2uM	3-23	1-7	JH3B	L2	JK4

2

[illegible]

FIG. 14

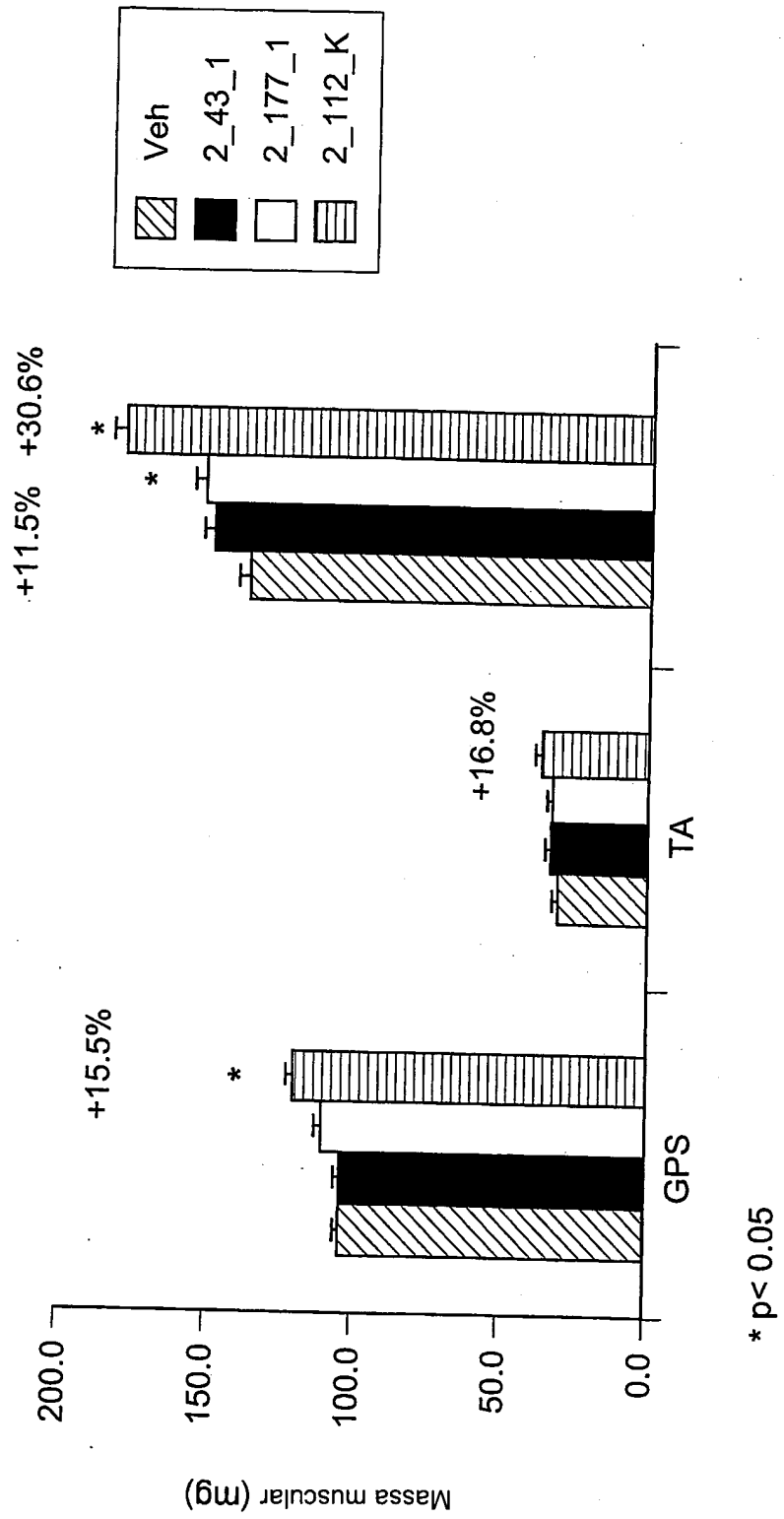


FIG. 15

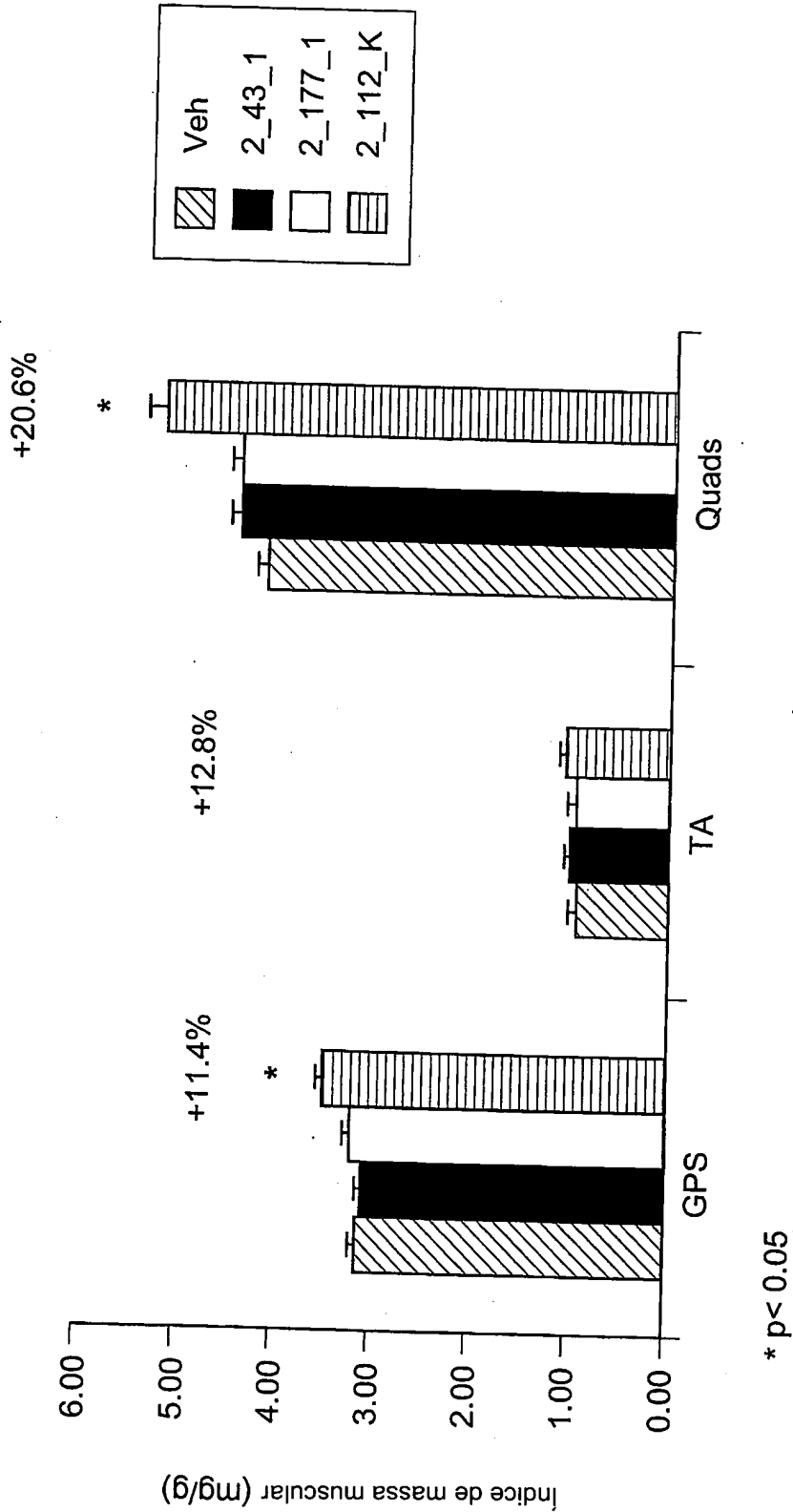


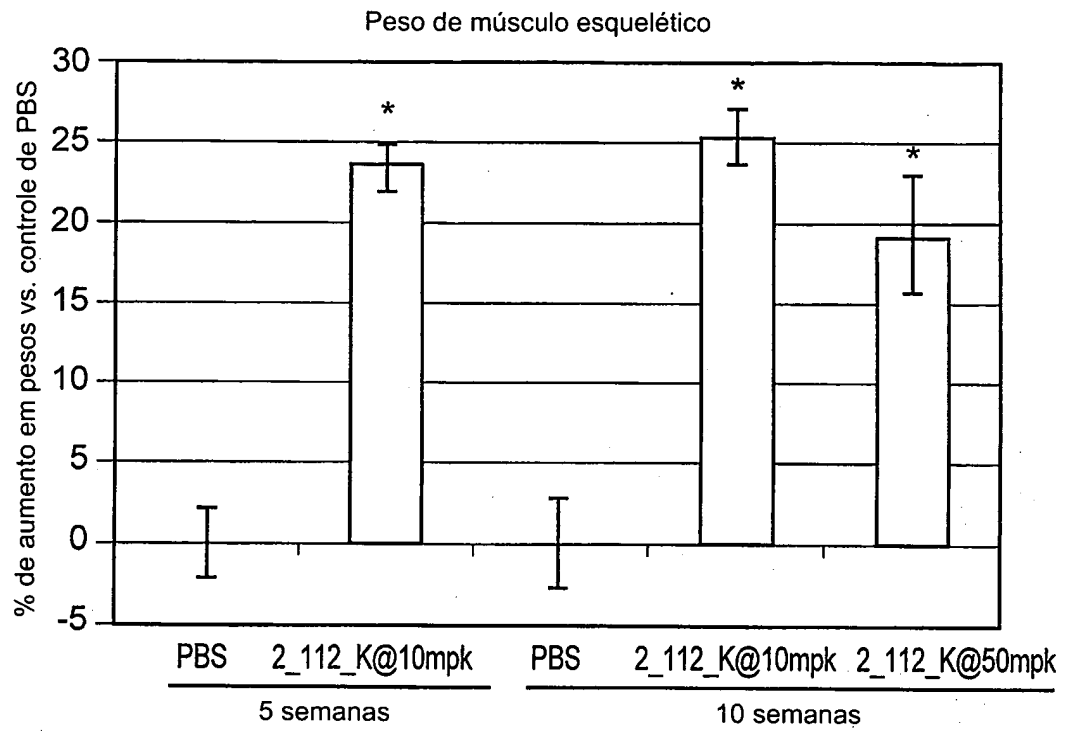
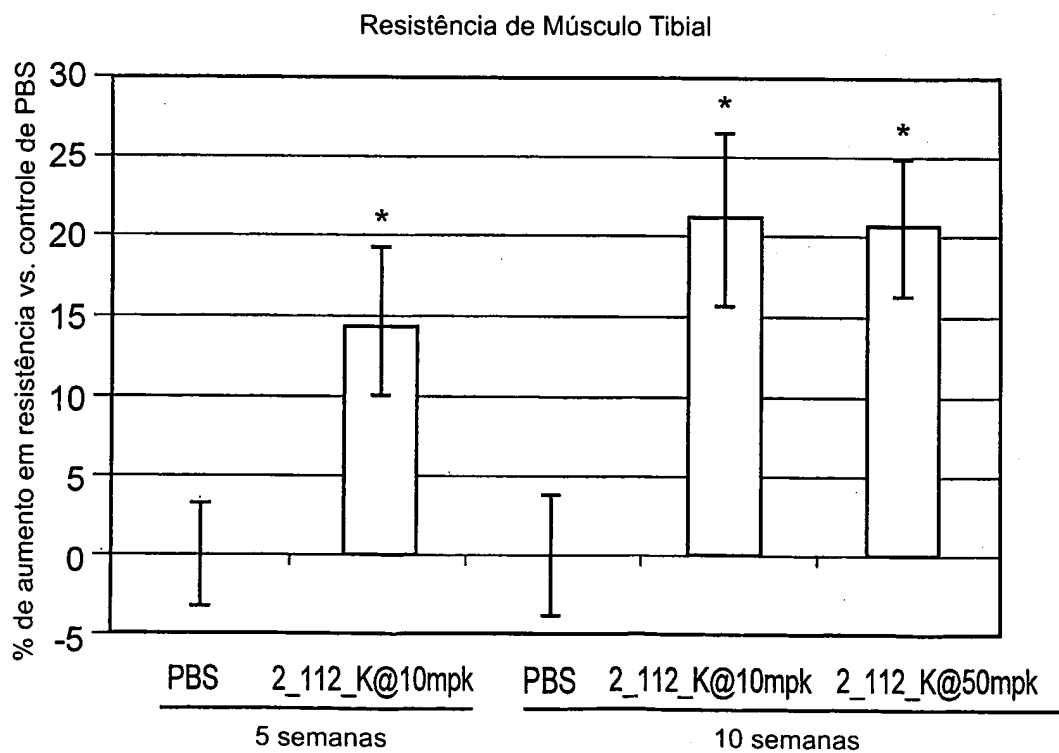
FIG. 16A**FIG. 16B**

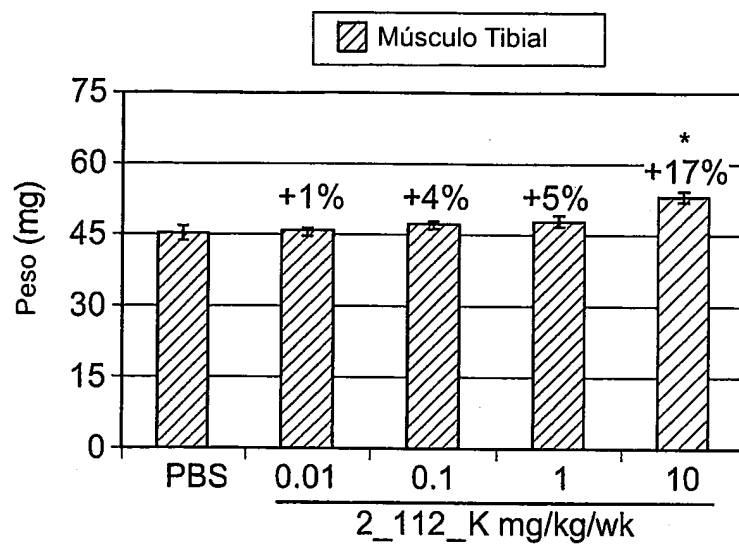
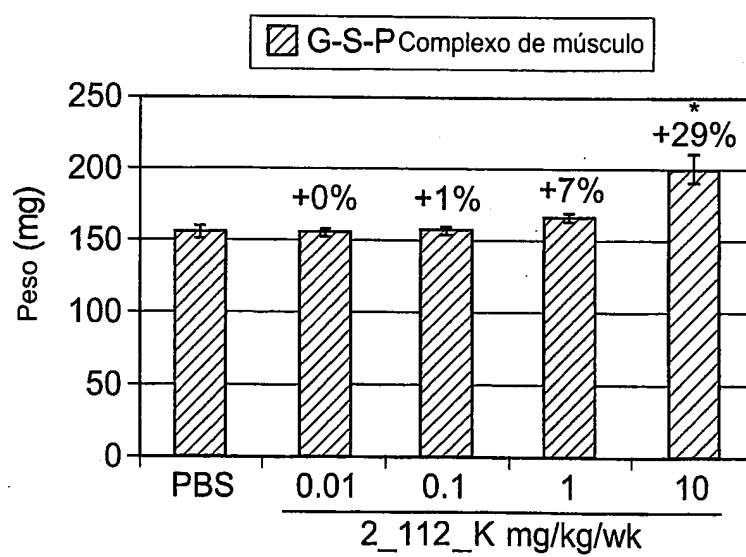
FIG. 17A**FIG. 17B**

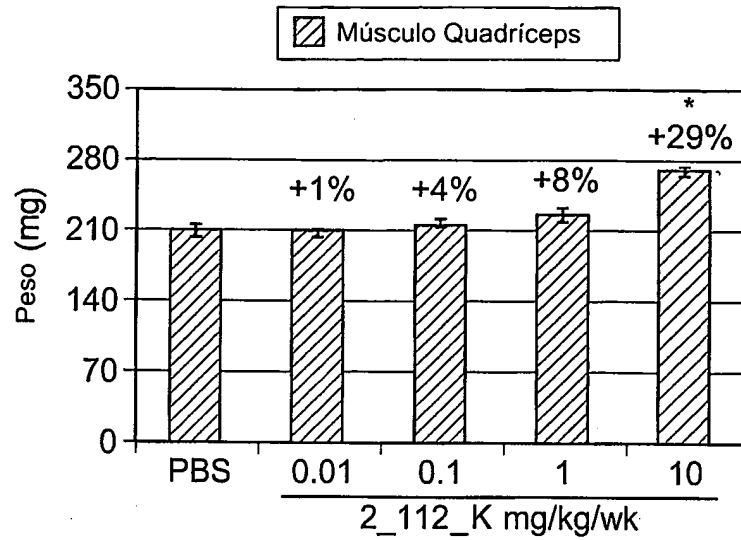
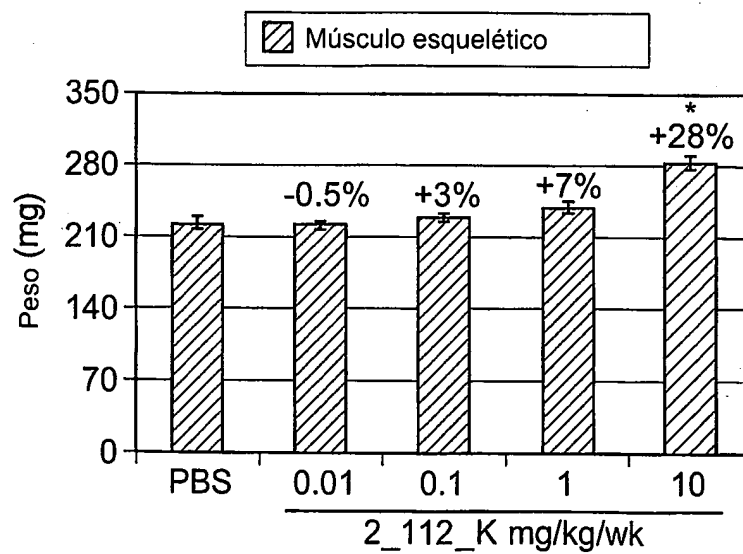
FIG. 17C**FIG. 17D**

FIG. 18A

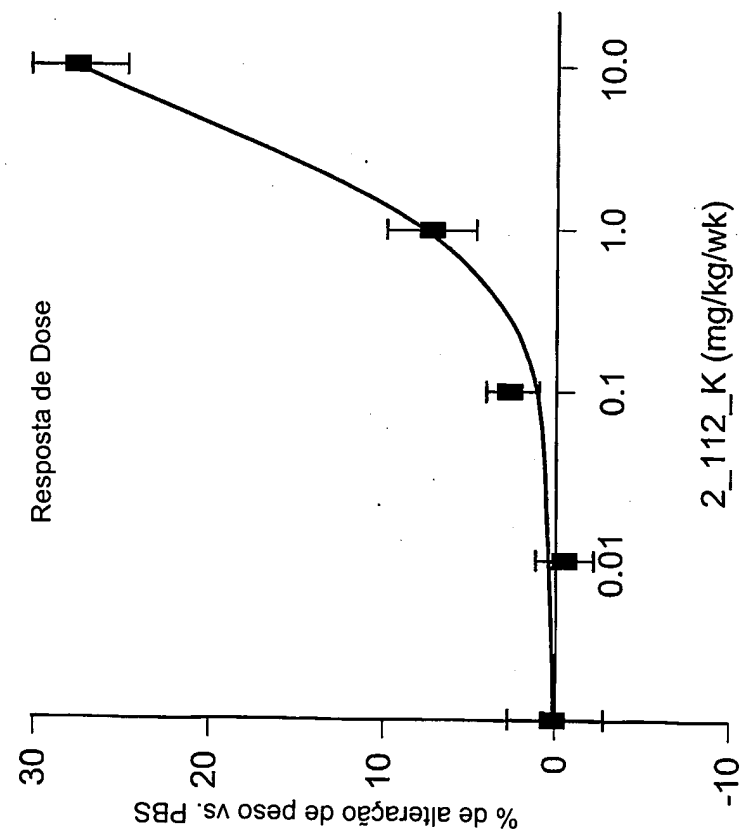


FIG. 18B

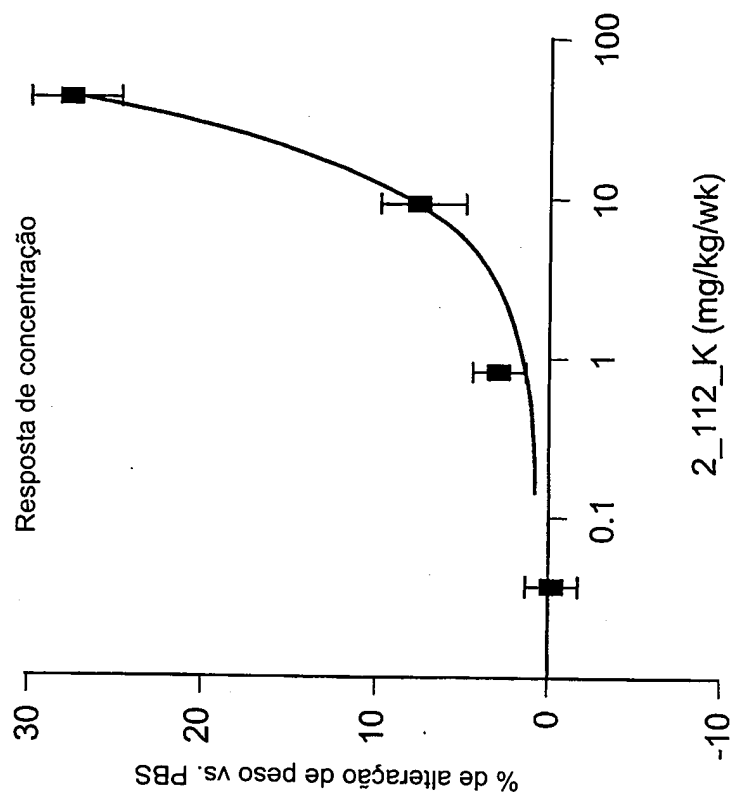


FIG. 19A

```

ANTIBODY2_112_1 EVQLLESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGYTFY 60
ANTIBODY2_112_K EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGYTFY 60
*****:*****
ANTIBODY2_112_1 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDG RYNWNYGAFDIWGQGTMTV 120
ANTIBODY2_112_K ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDG RYNWNYGAFDIWGQGTMTV 120
*****
ANTIBODY2_112_1 SS 122 SEQ ID NO:77
ANTIBODY2_112_K SS 122 SEQ ID NO:118
**

```

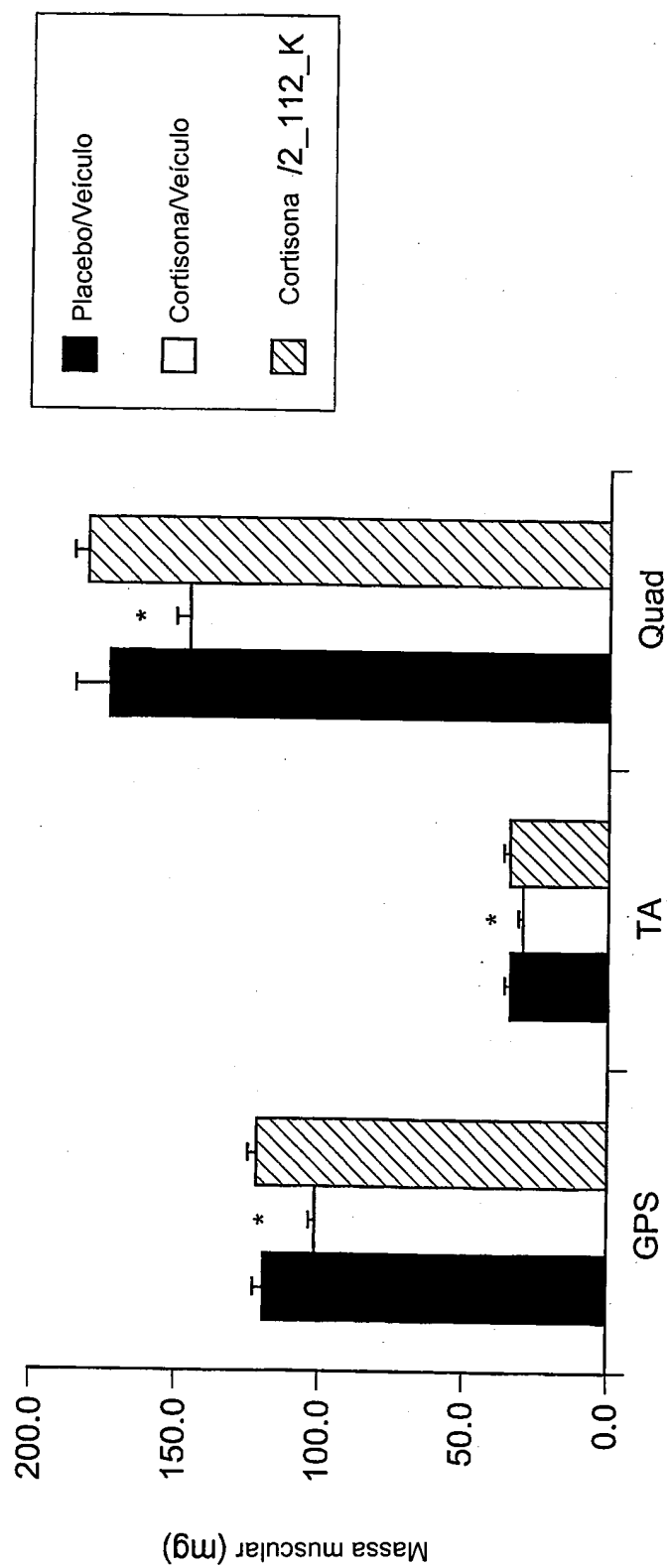
FIG. 19B

```

ANTIBODY2_112_1 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGFP 60
ANTIBODY2_112_K EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA 60
*****:*****
ANTIBODY2_112_1 RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAFYVCQQYNWPLTFEGGGTKVEIK 107 SEQ ID NO:79
ANTIBODY2_112_K RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAFYVCQQYNWPLTFEGGGTKVEIK 107 SEQ ID NO:120
*****:*****

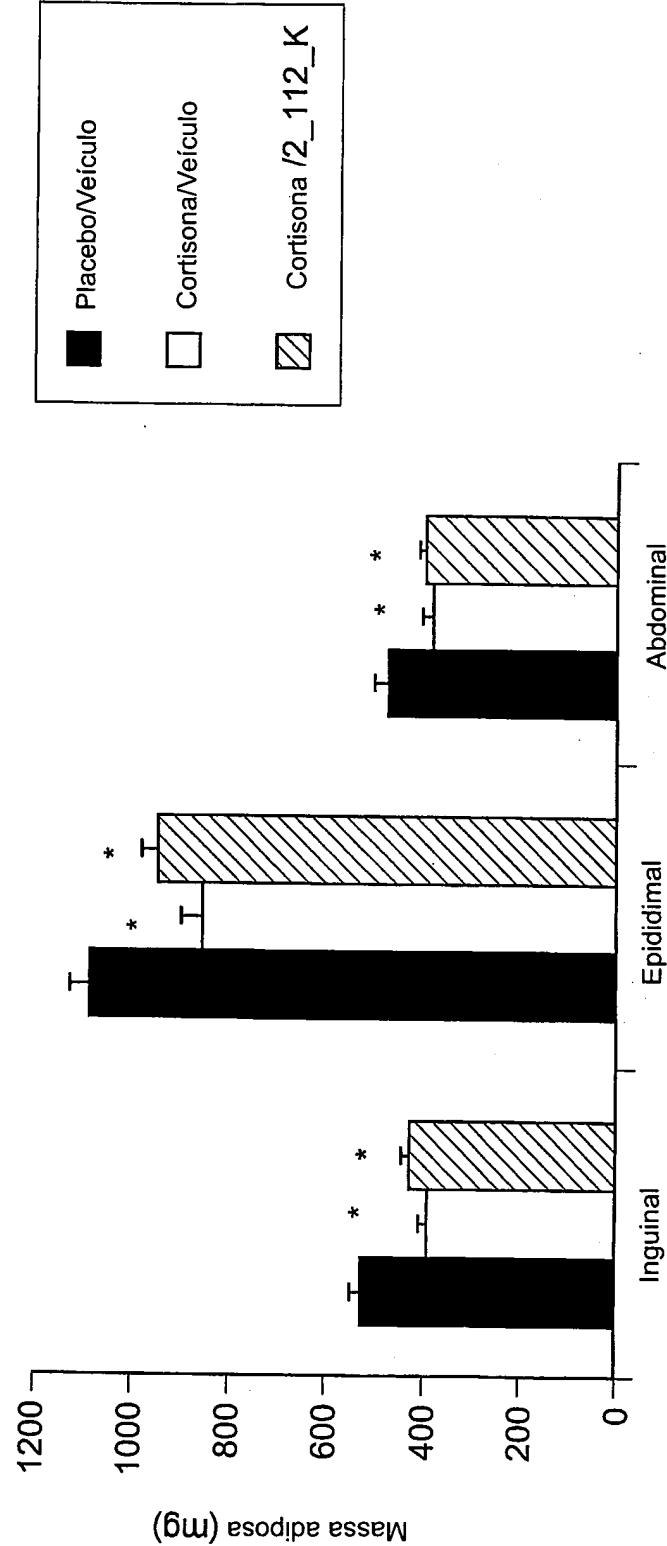
```

FIG. 20A



* p < 0.05 vs. Veículo/Placebo

FIG. 20B



* p < 0.05 vs. Placebo/Veículo

RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPOS CONTRA MIOSTATINA**".

A presente invenção refere-se a anticorpos que incluem anticorpos humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos que se ligam a miostatina, e que funcionam para inibir a miostatina. A invenção também
5 refere-se a anticorpos anti-miostatina humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos. A invenção também refere-se a anticorpos que são anticorpos de cadeia única quiméricos, biespecíficos, derivatizados ou partes de proteínas de fusão. A invenção também refere-se a imunoglobulinas isoladas
10 de cadeia pesada e leve derivadas de anticorpos anti-miostatina humanos e as moléculas de ácido nucléico que codificam tais imunoglobulinas. A presente invenção também refere-se a métodos para fabricar anticorpos anti-miostatina humanos, composições que compreendem estes anticorpos e métodos para utilizar os anticorpos e composições para diagnóstico e trata-
15 mento. A invenção também se proporciona métodos de terapia genética que utilizam moléculas de ácido nucléico que codificam as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e/ou leve que compreendem os anticorpos anti-miostatina humanos. A invenção também refere-se a animais transgênicos ou plantas que compreende as moléculas de ácido nucléico da presente invenção.
20

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICOR-
POS CONTRA MIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COM-
PREENDENDO OS MESMOS, LINHAS CELULARES QUE OS PRODU-
ZEM, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANTES DOS MES-
MOS BEM COMO SEUS USOS".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Um corpo crescente de fato indica que a miostatina (mstn, Fator de Crescimento e Diferenciação 8, ou GDF-8) regula negativamente o crescimento do músculo esquelético. Por exemplo, uma mutação nula de miostatina em uma criança
10 foi associada à hipertrofia muscular substancial sem qualquer anormalidade evidente (Schuelke et al. (2004) Miostatina Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *New Engl. J. Med.* 350:2682-8). Uma correlação negativa entre os níveis de proteína miostatina muscular e massa de músculo esquelético também foi demonstrada (Schulte, J.N. and Yarasheski, K.E. (2001). Effects of resistance training
15 on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11 Suppl:S111-820; Walker KS et al. (2004) Resistance training alters plasma miostatina but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sports Exerc.* 36(5):787-93.). Por exemplo, há uma expressão aumentada de níveis de miostatina muscular com a idade e a expressão de miostatina aumentada também mostrou contribuir com a atrofia
20 muscular em pacientes infectados com HIV (Gonzalez-cadavid et al. (1998) Organization of the human miostatina gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *PNAS* 95:14938-4321). Ademais, níveis elevados de miostatina foram encontrados em populações idosas. (Yarasheski KE et al., (2002) Serum miostatina-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with
25 muscle wasting. *J Nutr. Health Aging.* 6(5):343-8). A miostatina também influencia a massa óssea visto que os camundongos com deficientes de miostatina tiveram a densidade mineral óssea aumentada (Hamrick et al., (2003) Bone Architecture and Disc Degeneration in the Lumbar Spine of Mice Lacking GDF-8 (Miostatina). *J. Orthopaedic Res.* 21: 1025-1032 (e referências neste).

30 Os anticorpos para circular a miostatina mostraram causar massa muscular aumentada e homeostase da glicose aperfeiçoada em modelos murinos de diabetes melito tipo 2. A inibição de miostatina por injeção ip de

3. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o dito anticorpo ou parte se liga seletivamente à miostatina através de GDF11 por pelo menos 50 vezes.

4. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 3, onde o dito anticorpo ou parte inibe a ligação de miostatina a um receptor de activina tipo I ou tipo II.

5. Um anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno de acordo com o parágrafo 1, onde o anticorpo ou parte deste possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

10 (a) concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) se ligar à miostatina substancialmente com o mesmo K_D como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; e

(d) se ligar à miostatina substancialmente com a mesma dissociação que um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I;

ligou e imunoprecipitou GDF8 maduro e GDF8 maduro/completo de pró-peptídeo. Nenhum destes anticorpos imunoprecipitou GDF8 maduro, pró-peptídeo, ou GDF8 não-processado. Os anticorpos 2_112_1, 2_43_1 e 2_177_1, desta maneira, são anticorpos não-competitivos, e anticorpo 5 1_66_1 também é um anticorpo não-competitivo, porém um que se liga a um epitopo diferente de miostatina. Um anticorpo de neutralização não-competitivo, isto é, um que se liga à miostatina na presença de outras proteínas inibidoras, terá melhor eficácia in vivo do que um anticorpo competitivo.

Em outras modalidades, um anticorpo anti-miostatina da inven-
10 ção imunoprecipita GDF8 maduro a partir de soro de camundongo. Como descrito no Exemplo XI, os anticorpos monoclonais 2_112, 2_43_1 e 2_ obtêm mais GDF8 madura do que 1_116_1 e 1_66_1.

Especificidade de Espécie e Seletividade Molecular

Em outro aspecto da invenção, os anticorpos anti-miostatina
15 demonstram tanto especificidade de espécie como seletividade molecular. Em outras modalidades, o anticorpo anti-miostatina se liga a miostatina em seres humanos, camundongo, *Rattus norvegicus* (rato Norway), *cynomolgus* macaque (macaco), *Macaca fascicularis* (macaco caranguejeiro), *Meleagris gallopavo* (peru), *Sus scrofa* (porco), *Gallus gallus* (galo), *Gallus gallus* (ga-
20 lo), *Canis familiaris* (cão), *Equus caballus* (cavalo), *Coturnix chinensis* (codorna), *Coturnix coturnix* (codorna comum), e *Columba livia* (pombo comum). Após as instruções do relatório descritivo, alguém pode determinar a especificidade de espécie do anticorpo anti-miostatina utilizando métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, alguém pode determinar a especi-
25 ficidade de espécie utilizando análise de Western blot, ressonância de plásmo de superfície, por exemplo, BIAcore, ELISA, imunoprecipitação ou RIA.

Em outras modalidades, o anticorpo anti-miostatina possui uma seletividade de miostatina sobre GDF11 de pelo menos 50 vezes ou pelo
30 menos 100 vezes. GDF11 é um elemento de família próxima de miostatina que compartilha noventa por cento de identidade em sua proteína madura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-miostatina não exibe nenhuma

ficos das cadeias pesadas e leves de anticorpo 2_112_1 foi realizada ao designar iniciadores que utilizam o Kit de Mutagênese Sítio-Dirigida Quick-Change de Stratagene, de acordo com as instruções do fabricante. As mutações foram confirmadas por seqüenciamento automático, e os insertos mutagenizados foram subclonados em vetores de expressão. Estes vetores de expressão foram transfectados em células NS0 (ECACC Nº 85110503) e HEK-293T (American Type Culture Collection) para expressar anticorpos recombinantes da invenção. O anticorpo resultante que possui regiões de moldura novamente modificadas é designado anticorpo 2_112_K.

10 EXEMPLO III

Inibição de Miostatina por Anticorpos Anti-Miostatina Humanos (análise luciferase A204)

Uma análise de gene repórter responsivo de miostatina (vide, Thies, et al., *Growth Factors*, (2001) 18:251-259.) foi usada para avaliar a atividade biológica de miostatina ativa in vitro. Esta análise utiliza um vetor repórter pGL3(CAGA)₁₅ acoplado a luciferase. A seqüência de caixa CAGA (AGCCAGACA) (SEQ ID NO: 101) foi considerada como um elemento TGF-β-responsivo na região de promotor de um gene TGF-β-induzido, PAI-1. (Zawel, et al. *Mol. Cell*, (1998) 1:611-617). Este vetor repórter foi gerado ao inserir 15 cópias de caixas CAGA dentro dos sítios SmaI e XhoI de vetor promotor pGL3 (Promega, Cat. No. E1761). A linha celular de rabdomiosarcoma humano, A204 (Célula ATCC No. HTB-82), foi transfectada de forma transiente com pGL3(CAGA)₁₅ e CMV β-GAL utilizando o reagente de transfecção Fugene 6 (Roche Diagnostics, Cat. No. 1814443). As células transfectadas fora cultivadas em meio 5A de McCoy (Invitrogen, Cat. No. 16600) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de estreptomicina, e 100µg/ml de penicilina durante 16 horas. As células foram alteradas para meio de inanição (meio 5A de McCoy com estreptomicina, penicilina, e 1mg/ml de albumina de soro bovino), e então tratadas com miostatina, GDF11, ou activina durante 6 horas a 37°C. A atividade de luciferase foi medida utilizando o sistema de análise de luciferase Dual-light® (Applied Biosystems, Cat. No. T1004). A miostatina ativa o repórter a cerca de 10 vezes

do com a sugestão do fabricante (Invitrogen, Cat. No. K1032).

A expressão mediada por smad ativada por miostatina do repórter a cerca de 2 a 3 vezes com EC50 em torno de 5ng/ml. GDF11 e activina ativaram o repórter na resposta muito similar.

5 A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30 minutos antes da adição às células LD10 de miostatina L6. Como mostrado nas Figuras 2 e 11, todos os anticorpos anti-miostatina humanos testados inibiram a ativação de proteína smad em uma faixa de cerca de 1 a cerca de 225 nM.

10 EXEMPLO V

Inibição de Fosforilação Smad 2 induzida por Miostatina (Western Blot)

As células do carcinoma hepatocelular HepG2 humanas (ATTC Cell No. HB-8065) foram cultivadas em DMEM de alta glicose (Invitrogen, Cat. No. 11995) suplementadas com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/ml de estreptomicina, e 100µg/ml de penicilina. 60 a 70% de células confluente foram alteradas para o meio de inanição (DMEM com estreptomicina, penicilina, e 0,5% de FBS) durante a noite. As células foram tratadas com miostatina durante 30 minutos. A atividade de neutralização de um anticorpo foi determinada ao pré-incubar o anticorpo com miostatina durante 30 minutos antes da adição às células HepG2. As células foram lisadas por western blot. Smad2 fosforilado foi detectado utilizando um anticorpo anti-fosfo-Smad2 de coelho (Cell Signalling, Cat. No. 3101), que foi então detectado por Alex 680 Anti-coelho (Molecular Probes, Cat. No. **A21076**). A quantidade de Smad fosforilado Smad2 foi quantificada utilizando Odyssey Infrared Imager (Li-Cor). A desidrogenase de gliseraldeído-3-fosfato (**GAPDH**) foi usada para normalização. Como mostrado na **Figura 3**, todos os anticorpos **anti-miostatina** humanos de neutralização testados inibiram a fosforilação de **smad 2**.

EXEMPLO VI

30 Expressão Aumentada de *myf5* por Anticorpos Anti-Miostatina Humanos

Os mioblastos C2C12 (ATCC Cell No. CRL-1772) foram cultivados em DMEM de alta glicose (Invitrogen, Cat. No. 11995) suplementados

pecífico para massa muscular, a massa de placa de gordura foi determinada. Para massa de placa de gordura, as placas de gordura inguinais, epididimais e abdominais foram dissecadas e pesadas. O tratamento com anticorpo 2_112-K não evitou significativamente ($p < 0,05$) a perda na massa de placa de gordura devido ao implante de cortisona em placas de gordura inguinais, (cortisona/veículo ($75,1 \pm 4,7\%$) e cortisona/2_112_K, ($82,3 \pm 5,3\%$)), epididimais (cortisona/veículo ($79,3 \pm 5,0\%$) e cortisona/2_112_K ($87,1 \pm 3,9\%$)), ou abdominais, (cortisona/veículo ($79,5 \pm 5,5\%$) e cortisona/2_112_K ($82,2 \pm 4,2\%$)). Os valores foram expressos com relação à placa de gordura de placebo/veículo. Os resultados deste experimento são mostrados nas Figuras 20A e 20B.

EXEMPLO XVI

Purificação de Proteína A de Anticorpo de Miostatina

1 a 2 litros de meio concentrado (10 vezes) HEK293 foi filtrado (2 microns) e carregado sobre uma coluna de proteína A equilibrada (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (53 mLs, equilibrados com 5 volumes de coluna de D-PBS, pH 7,0) em 2 mL/min. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão acetato (20 mM de acetato de sódio, pH 5,5) e a proteína eluída com 4 volumes de coluna de pH 3,2 a 3,5 de acetato de sódio (20 mM). O pH do eluato foi ajustado para pH 5,5 com hidróxido de sódio e filtrado, se necessário. Por fim, o material foi concentrado a 10 mg/mL, dialisado em 140mM de cloreto de sódio, 20 mM de acetato de sódio, pH 5,5, filtrado e armazenado a 4 graus C.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descritivo estão incorporados aqui à guisa de referência como se cada publicação individual ou pedido de patente estivesse indicado de forma específica e individual para ser incorporado à guisa de referência. Embora a invenção anterior seja descrita em alguns detalhes à guisa de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de compreensão, será facilmente avaliado pelo versado na técnica, em consideração com as instruções desta invenção, que certas alterações e modificações podem ser feitas neste sem que se abandone o espírito ou escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano, quimérico ou humanizado ou uma parte de ligação de antígeno deste que se liga especificamente à miostatina, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo ou parte se liga seletivamente à miostatina sobre GDF11 por pelo menos 50 vezes, e em que o dito anticorpo ou parte inibe a ligação de miostatina a um receptor de activina tipo I ou tipo II, e de que o referido anticorpo é um anticorpo neutralizante não-competitivo.

2. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste caracterizado pelo fato de que possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) competir pela ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; e

(b) se ligar ao mesmo epitopo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V.

3. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um conjunto de CDR, CDR1, CDR2 e CDR3, que de forma seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs, CDR1, CDR2, e CDR3 de cadeia pesada, de forma seqüencial juntamente, que estão incluídas na seqüência de aminoácido estabelecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85 e 118;

(b) um conjunto de CDR, CDR1, CDR2 e CDR3, que de forma

seqüencial juntamente são pelo menos 90% idênticos em seqüência de aminoácido a CDRs, CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de forma seqüencial juntamente, que estão incluídas na seqüência de aminoácido estabelecida em qualquer uma entre SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87 e 120; ou

(c) um primeiro conjunto de CDR de (a) e um segundo conjunto de CDR de (b).

4. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno deste caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a miostatina, em que:

(a) a cadeia pesada compreende as seqüências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) a cadeia leve compreende as seqüências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V; ou

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b).

5. Anticorpo monoclonal caracterizado pelo fato de ser selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

(c) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

5 (e) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20;

(f) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

10 (g) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

(h) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

(i) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

15 (j) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e

20 (l) um anticorpo que compreende as seqüências de aminoácido estabelecidas na SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

6. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno deste caracterizado pelo fato de ser selecionado a partir do grupo que consiste em:

25 (a) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

(b) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;

30 (c) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12;

(d) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende

de as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16;

(e) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 20;

(f) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24;

(g) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28;

(h) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32;

(i) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36;

(j) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40;

(k) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44; e

(l) um anticorpo ou parte de ligação de antígeno que compreende as seqüências de aminoácido de domínio variável estabelecidas na SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 117.

7. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno do mesmo compreendendo um primeiro conjunto de seqüência CDR que compreende um primeiro conjunto CDR1, primeiro CDR2 e primeiro CDR3 e um segundo conjunto de seqüência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo, caracterizado pelo fato de que cada dito primeiro conjunto CDR e o dito segundo conjunto CDR de forma seqüencial junta-

mente possuem pelo menos 90% de identidade com as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de:

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

- 15 8. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno do mesmo compreendendo um primeiro conjunto de seqüência CDR que compreende um primeiro CDR1, primeiro CDR2 e primeiro CDR3 e um segundo conjunto de seqüência CDR que compreende um segundo CDR1, segundo CDR2 e segundo CDR3, caracterizado pelo fato de que onde cada dito primeiro conjunto CDR e dito segundo conjunto são as seqüências CDR1, C-
20 DR2 e CDR3, de forma seqüencial juntamente, de:

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

(I) SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117, respectivamente.

5 9. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente à miostatina caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de aminoácido de cadeia pesada estabelecida em SEQ ID NO:115 e a seqüência de aminoácido de cadeia leve estabelecida em SEQ ID NO:117.

10. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo caracterizado pelo fato de que compreende as regiões variáveis contidas em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

10 11. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, que se liga especificamente à miostatina caracterizado pelo fato de que compreende CDRs CDR1, CDR2, e CDR3 contidas em SEQ ID NO:115 e SEQ ID NO:117.

15 12. Anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno se liga às partes de peptídeo 1 e peptídeo 5 de miostatina, em que o peptídeo 1 compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 103 e peptídeo 5 compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 107.

20 13. Anticorpo caracterizado pelo fato de ser produzido por uma célula que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

25 14. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

30 15. Uso de um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 caracterizado pelo fato de ser para produzir uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 14, em que o dito anticorpo, parte de ligação de antígeno ou composição farmacêutica inibe a atividade de miostatina, para promover aumento de

massa muscular, promoção de desenvolvimento de músculo esquelético, tratamento de um distúrbio de atrofia muscular ou aumento de crescimento de músculo esquelético.

5 16. Linha celular isolada caracterizada pelo fato de que produz um anticorpo ou uma parte anticorpo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 ou a cadeia pesada ou cadeia leve do dito anticorpo ou dita parte de ligação de antígeno.

10 17. Molécula de ácido nucléico isolada caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação de antígeno da mesma ou a cadeia leve ou uma parte de ligação de antígeno da mesma de um anticorpo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13.

15 18. Uso de um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13 em que o dito anticorpo ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina, caracterizado pelo fato de ser para produzir uma composição farmacêutica para aperfeiçoamento de homeostase da glicose, redução de massa de gordura, aumento da sensibilidade à insulina, aperfeiçoamento de função de rim, redução de acúmulo de gordura, tratamento, prevenção ou inibição de
20 uma doença ou condição é caracterizada por perda óssea, sendo que a dita doença ou condição inclui osteoporose, osteopenia, osteoartrite e fraturas ósseas, tratamento de síndrome metabólica, ou neutralização de atrofia muscular a partir de administração prolongada de um glicocorticóide ou um hormônio esteróide durante o tempo em que o indivíduo está submetido ao
25 tratamento com um glicocorticóide ou um hormônio esteróide.

19. Uso do anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina caracterizado pelo fato de ser para produzir uma
30 composição farmacêutica para reduzir a atividade de miostatina em um indivíduo necessitado do mesmo.

20. Uso do anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de

antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina caracterizado pelo fato de ser para produzir uma composição farmacêutica para reverter o declínio relacionado à idade em massa muscular em um indivíduo necessitado do mesmo.

21. Linha de célula hospedeira de mamífero caracterizada pelo fato de que compreende polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo humano, quimérico ou humanizado que concorre para a ligação à miostatina com um anticorpo ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo, em que o anticorpo ou parte do mesmo possui pelo menos uma propriedade selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) concorrer para a ligação à miostatina com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em: 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(b) se ligar ao mesmo epítipo de miostatina como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em 1_116_1; 1_136_3; 1_257_1; 1_46_1; 2_112_1; 1_314_1; 1_66_1; 2_43_1; 2_177_1; 1_132_1; 1_268_1; 2_112_K; 1_116_1L-Q45K; 1_257_1L-L21I; 1_314_1H-T92A; 1_46_1H-L81M; 2_112_1H-I12V; 2_112_1L-F58I; 2_112_1L-I85V; 2_112_1H-L81M, L-F58I; 2_112_1H-L81M, L-I85V; e 2_112_1H-L81M, L-F58I, I85V;

(c) é um anticorpo que possui a mesma sequência de aminoácido que o anticorpo produzido por uma célula de hibridoma que possui um Número de Designação de Depósito ATCC selecionado a partir do grupo que consiste em PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576; e

(d) é uma linha celular de hibridoma selecionada a partir do grupo que consiste em Números de Designação de Depósito ATCC PTA-6566, PTA-6567, PTA-6568, PTA-6569, PTA-6570, PTA-6571, PTA-6572, PTA-6573, PTA-6574, PTA-6575, e PTA-6576.

22. Uso do anticorpo monoclonal ou uma parte de ligação de antígeno do mesmo como definido em quaisquer reivindicações 1 a 13, em que o dito anticorpo monoclonal ou parte de ligação de antígeno inibe a atividade de miostatina caracterizado pelo fato de ser para produzir uma composição farmacêutica para promover o crescimento muscular, ganho de peso ou auxílio na prevenção de fraqueza em gado, suíno, carneiro, frangos, perus, cavalos, peixe, cães e gatos necessitados do mesmo.
- 5

RESUMO

Patente de Invenção: "ANTICORPOS CONTRA MIOSTATINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS, LINHAS CELULARES QUE OS PRODUZEM, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO
5 CODIFICANTES DOS MESMOS BEM COMO SEUS USOS".

A presente invenção refere-se a anticorpos que incluem anticorpos humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos que se ligam a miostatina, e que funcionam para inibir a miostatina. A invenção também refere-se a anticorpos anti-miostatina humanos e partes de ligação de antígeno dos mesmos. A invenção também refere-se a anticorpos que são anticorpos de cadeia única quiméricos, biespecíficos, derivatizados ou partes de proteínas de fusão. A invenção também refere-se a imunoglobulinas isoladas de cadeia pesada e leve derivadas de anticorpos anti-miostatina humanos e as moléculas de ácido nucléico que codificam tais imunoglobulinas. A presente invenção também refere-se a métodos para fabricar anticorpos anti-miostatina humanos, composições que compreendem estes anticorpos e métodos para utilizar os anticorpos e composições para diagnóstico e tratamento. A invenção também se proporciona métodos de terapia genética que utilizam moléculas de ácido nucléico que codificam as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e/ou leve que compreendem os anticorpos anti-miostatina humanos. A invenção também refere-se a animais transgênicos ou plantas que compreende as moléculas de ácido nucléico da presente invenção.