

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 094**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2005 E 05764255 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **25.04.2007 EP 1776136**

54 Título: **Tratamiento de afecciones que implican la desmielinización**

30 Prioridad:

24.06.2004 US 582966 P

07.10.2004 US 617297 P

15.11.2004 US 628435 P

13.05.2005 US 680475 P

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

08.02.2013

73 Titular/es:

BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)

14 CAMBRIDGE CENTER

CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US

72 Inventor/es:

MI, SHA;

PEPINSKY, R. BLAKE y

MCCOY, JOHN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 395 094 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de afecciones que implican la desmielinización

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a la Neurobiología, la Neurología y la Farmacología. Más concretamente, se refiere a antagonistas de Sp35 para su uso en procedimientos de tratamiento de la esclerosis múltiple según lo definido en las reivindicaciones.

Antecedentes de la técnica

- 10 Muchas enfermedades del sistema nervioso están asociadas con la desmielinización y la dismielinización, incluyendo la esclerosis múltiple (EM), la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), la encefalomiелitis (EPL), la mielosis central pontina (MCP), la degeneración de Wallerian y algunas enfermedades hereditarias tales como la adrenoleucodistrofia, la enfermedad de Alexander y la enfermedad de Pelizaens Merzbacher (PMZ). Entre estas enfermedades, la EM es la más extendida, afectando a aproximadamente 2,5 millones de personas en todo el mundo.
- 15 En general, la EM comienza con un patrón de recaídas y remisiones de implicación neurológica, que luego progresa a una fase crónica con un aumento del daño neurológico. La EM está asociada con la destrucción de la mielina, los oligodendrocitos y los axones ubicados en las lesiones crónicas. La desmielinización observada en la EM no siempre es permanente, habiéndose documentado la remielinización en fases tempranas de la enfermedad. Para la remielinización de las neuronas, se necesitan oligodendrocitos.
- 20 Hay diversos tratamientos modificadores de la enfermedad de la EM disponibles, incluyendo el uso de corticosteroides e inmunomoduladores tales como el interferón beta. Además, debido al papel fundamental de los oligodendrocitos y de la mielinización en la EM, se han hecho esfuerzos por desarrollar terapias para aumentar los números de oligodendrocitos o aumentar la mielinización. Véase, por ejemplo, Cohen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.574.009; Chang *et al.*, *N. Engl J. Med.* 346:165-73 (2002). Sin embargo, sigue existiendo la urgente necesidad de crear más terapias para la EM. La solicitud de patente internacional W02004085648A2, publicada el 7 de octubre de 2004, revela antagonistas de Sp35 para tratar enfermedades, lesiones y trastornos neurológicos mediante la potenciación de la supervivencia neuronal.
- 25

Breve resumen de la invención

- 30 La presente invención se basa en el descubrimiento de que Sp35 (Sp35 también se denomina en la bibliografía LINGO-1 y LRRN6) se expresa en oligodendrocitos y regula negativamente la diferenciación de los oligodendrocitos, la supervivencia y la mielinización de los axones. Además, ciertos antagonistas de Sp35 potencian la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de los oligodendrocitos, así como la mielinización de las neuronas. En base a estos descubrimientos, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para potenciar la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos, procedimiento que comprende poner en contacto oligodendrocitos que
- 35 expresan a Sp35 con una cantidad eficaz de una composición que comprende un antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido Sp35 soluble que carece de un dominio transmembrana de Sp35 y un dominio citoplasmático de Sp35;
- (ii) un anticuerpo contra Sp35 o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- 40 (iii) un polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido antisentido; (b) una ribozima; (c) un ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (d) un ARN en horquilla pequeño (ARNhp); y
- (iv) una combinación de dos o más de dichos antagonistas de Sp35.

- 45 La presente invención también proporciona un antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido Sp35 soluble que carece de un dominio transmembrana de Sp35 y un dominio citoplasmático de Sp35;
- (ii) un anticuerpo contra Sp35 o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- 50 (iii) un polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido antisentido; (b) una ribozima; (c) un ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (d) un ARN en horquilla pequeño (ARNhp); y

- (iv) una combinación de dos o más de dichos antagonistas de Sp35;

para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la esclerosis múltiple en un mamífero mediante la potenciación de la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos que expresan a Sp35.

- 5 Los polipéptidos Sp35 solubles incluyen polipéptidos que comprenden (i) un dominio de repetición rico en leucina (LRR) de Sp35, (ii) un extremo C-terminal de la región básica de Sp35 con respecto al dominio LRR y (iii) un dominio de inmunoglobulina (Ig) de Sp35. En algunas realizaciones, el polipéptido Sp35 soluble carece de un dominio Ig de Sp35, de un dominio LRR de Sp35, un dominio transmembrana y de un dominio citoplasmático. En algunas realizaciones, el polipéptido Sp35 soluble comprende un dominio LRR de Sp35 y carece de un dominio Ig de Sp35, una región básica de Sp35, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. En algunas realizaciones, el polipéptido Sp35 soluble comprende los residuos de aminoácido 34-532 de la SEC ID N.º 2.

En algunas realizaciones, el antagonista de Sp35 es para administrarse mediante inyección en bolo o infusión crónica. En algunas realizaciones, el polipéptido Sp35 soluble es para administrarse directamente en el sistema nervioso central. En algunas realizaciones, el polipéptido Sp35 soluble es para administrarse directamente en una lesión crónica de EM.

- 15 En algunas realizaciones, el antagonista de Sp35 es un polipéptido de fusión que comprende un resto no Sp35. En algunas realizaciones, el resto no Sp35 se selecciona del grupo que consiste en un resto de anticuerpo Ig, un resto de albúmina de suero, un resto dirigido, un resto indicador y un resto facilitador de la purificación. En algunas realizaciones, el resto de anticuerpo Ig es un resto de la región bisagra y de Fc.

- 20 En algunas realizaciones, los polipéptidos y los anticuerpos usados en la presente invención están conjugados con un polímero. En ciertas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en un polialquilenglicol, un polímero de azúcar y un polipéptido. En algunas realizaciones, el polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, los polipéptidos y los anticuerpos usados en la presente invención están conjugados con 1, 2, 3 ó 4 polímeros. En algunas realizaciones, el peso molecular total de los polímeros es de 5.000 Da a 100.000 Da.

La invención se define en el conjunto de las reivindicaciones anexas.

25 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es la secuencia de nucleótidos de un ADNc de Sp35 humano de longitud completa (SEC ID N.º 1).

La Figura 2 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido Sp35 humano de longitud completa (SEC ID N.º 2).

La Figura 3 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica el polipéptido Sp35 murino de longitud completa (SEC ID N.º 3).

- 30 La Figura 4 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido Sp35 murino de longitud completa (SEC ID N.º 4).

Figura 5: Sp5 (LINGO-1) se expresa en oligodendrocitos. Análisis de RT-PCR de la expresión del ARNm de LINGO-1 en cultivos de neuronas CG P13 (p13CGN), oligodendrocitos y astrocitos. Se analizó la expresión de GAPDH en las mismas muestras como un control interno.

- 35 Figuras 6A y 6B: (A) Análisis de RT-PCR de la expresión del ARNm de Sp5 (LINGO-1) en oligodendrocitos infectados con ARNi y un control sin infectar. Se usó β -actina como patrón interno. (B) Cuantificación de oligodendrocitos maduros en cultivos tratados con ARNi.

- 40 Figura 7: Expresión de ARNm de Sp35 (LINGO-1) en oligodendrocitos en diversas fases del desarrollo. Se indujo la diferenciación de los oligodendrocitos y se llevó a cabo una cuantificación de Sp35 mediante RT-PCR. Los datos se normalizaron con respecto a los niveles de GAPDH como control interno. Los oligodendrocitos del progenitor tempranos (A2B5⁺) y los oligodendrocitos premielinizantes (O4⁺) mostraron niveles equivalentes de ARNm de Sp35, pero el nivel de ARNm de Sp35 fue más del doble en los oligodendrocitos maduros (MBP⁺).

- 45 Figura 8: Diferenciación dependiente de la dosis de los oligodendrocitos tras un tratamiento con LINGO-1-Fc exógeno en comparación con un tratamiento con un polipéptido Fc control. Los datos se cuantificaron mediante el recuento del número de oligodendrocitos maduros (identificados por la presencia de láminas de mielina) como un porcentaje de los oligodendrocitos O4⁺ totales. Para cada muestra, se contaron aproximadamente 800 células.

Figura 9: Los antagonistas de LINGO-1 (Sp5) regulan RhoA y Fyn. (A) cantidades de RhoA-GTP en los oligodendrocitos tratados con LINGO-1-Fc detectadas mediante transferencia Western. (B) Expresión y fosforilación de Fyn (pFyn) en oligodendrocitos infectados con lentivirus que porta FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 o plásmidos de control detectadas mediante transferencia Western.

- 50 Figura 10A: Los antagonistas de LINGO-1 potencian la mielinización axonal por parte de los oligodendrocitos. Análisis cuantitativo de la mielinización en cocultivos tratados con LINGO-1-Fc (10 μ g/ml) durante 2 semanas. Para cada muestra, se contaron diez campos de células teñidas para MBP⁺.

Figura 10B: Transferencias Western de cocultivos de 4 semanas tratados con LINGO-1-Fc exógeno y un polipéptido Fc control usando anticuerpo anti-MBP para detectar la presencia de la proteína MBP.

Figuras 10C y 10D: Análisis de microscopía electrónica de cocultivos que se trataron con LINGO-1-Fc (C) o con Fc control (D) durante 4 semanas. Se indica el nodo de la estructura de Ranvier. Barra de escala: 1,5 µm.

5 Figuras 10E y 10F: Mielinización en cocultivos que se infectaron con FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 y lentivirus de control durante dos semanas. Las células MBP⁺ se contaron mediante inmunofluorescencia (E). Transferencias Western de los cultivos infectados con FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 y lentivirus de control analizadas para la MBP y para LINGO-1 usando un anticuerpo contra el marcador de hemaglutinina (F).

10 Figura 10G: Mielinización en cocultivos en los que sólo se han infectado células de los ganglios radicales posteriores (GRD infectadas) u oligodendrocitos (oligo infectados) o ambos (ambos infectados) con FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 y lentivirus de control.

15 Figuras 11A y 11B: Microscopía electrónica que muestra (A) análisis visual y (B) análisis cuantitativo de fibras axonales mielinizadas en médulas espinales de tipo natural y con LINGO-1 desactivado de ratones P1. Se analizaron cuatro médulas espinales; para cada muestra, se contaron las fibras axonales mielinizadas de diez campos. Los datos mostrados son los valores medios de todas las mediciones.

Figura 12: Se inyectó quirúrgicamente Sp5-Fc (LINGO-1-Fc) o un polipéptido de control a ratones tratados con cuprizona según lo descrito en la presente memoria. Los animales que recibieron el tratamiento de Sp35-Fc mostraron una mayor supervivencia de los oligodendrocitos maduros (en base a una tinción con anticuerpo CC1).

20 Figura 13: Análisis de TUNEL de las células PC12 diferenciadas 18 horas después de la retirada de NGF tratadas con Sp35-Fc (LINGO-1-Fc) o con un control. Las células tratadas con Sp5-Fc sufrieron una menor apoptosis.

Figura 14: Apoptosis de células PC12 diferenciadas privadas de soporte trófico 18 horas después de retirar el NGF de los medios de cultivo tratados con Sp35-Fc (LINGO-1), el inhibidor de la caspasa zVAD o un polipéptido de control. Las células tratadas con el polipéptido de control mostraron la mayor muerte celular.

25 Figura 15: Transferencia Western de cocultivos tratados con LINGO-1-Ig-Fc exógeno, LINGO-1-Ig-Fc mutante (arginina de la posición 456 cambiada por histidina), LINGO-1-Fc y un polipéptido Fc de control usando anticuerpo anti-MBP para detectar la presencia de la proteína MBP.

Figura 16: Transferencias Western de 4 cocultivos tratados con péptidos cíclicos LINGO-1-Ig exógenos y péptidos cíclicos LINGO-1-Ig mutados, según lo descrito en el Ejemplo 6, usando anticuerpo anti-MBP para detectar la presencia de la proteína MBP.

30 Descripción detallada de la revelación

Definiciones

35 A no ser que se defina lo contrario, todas las expresiones y todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados comúnmente entendidos por cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente revelación. En caso de conflicto, se tomará como referencia la presente solicitud que incluye las definiciones. A no ser que lo exija el contexto, los términos y las expresiones en singular incluyen las formas en plural, y los términos y las expresiones en plural incluyen las formas en singular.

40 Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o probar la presente revelación, más adelante, se describen materiales y procedimientos adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no han de considerarse como restrictivos. Hay otras características y ventajas de la revelación que resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Para definir más detalladamente la presente revelación, se proporcionan los siguientes términos y definiciones.

45 Cabe señalar que los términos “un”, “uno” y “una” se refieren a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que “una molécula de inmunoglobulina” representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Como tales, los términos “un”, “uno” y “una”, “uno/a o más” y “al menos uno/a” se pueden usar indistintamente en la presente memoria.

A lo largo de la presente memoria y de las reivindicaciones, el término “comprende” o las variaciones tales como “que comprende” indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros citado, pero sin la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

50 Como se usa en la presente memoria, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y en los periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, la disminución de los síntomas, la prolongación de la supervivencia, la mejora de

la movilidad y similares. Un resultado terapéutico no tiene que ser necesariamente la “cura”.

Como se usa en la presente memoria, una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz a las dosis y en los periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Comúnmente, como la dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una fase anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se usa en la presente memoria, un “polinucleótido” puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de longitud completa, incluyendo las secuencias 5’ y 3’ no traducidas, las secuencias codificantes, así como los fragmentos, epítomos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. El polinucleótido puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ADN o ADN sin modificar, o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos de ADN mono- o bi-catenario, ADN que sea una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario y ARN que sea una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprendan ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más comúnmente, bicatenario o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, los polinucleótidos pueden estar compuestos de regiones tricatenarias que comprendan ARN o ADN, o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también pueden contener una o más bases modificadas o la estructura central de ADN o ARN modificada por motivos de estabilidad u otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco habituales tales como la inosina. Se puede hacer una variedad de modificaciones al ADN y al ARN. Así pues, “polinucleótido” engloba formas modificadas química, enzimática y metabólicamente.

En la presente revelación, un polipéptido puede estar compuesto de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y puede contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes (por ejemplo, aminoácidos no naturales). Los polipéptidos de la presente revelación se pueden modificar mediante cualquier procedimiento natural, tal como procesamiento posterior a la traducción o mediante técnicas de modificación química que sean ampliamente conocidas en la materia. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monográficos más detallados, así como en la amplia documentación de investigación. Las modificaciones se pueden producir en cualquier punto del polipéptido, incluyendo la estructura central peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los terminales amino o carboxilo. Ha de reconocerse que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en diferentes grados en varios sitios de un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales posteriores a la traducción o se pueden preparar mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de un resto hemo, enlace covalente de un nucleótido o un derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o un derivado de lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces de tipo disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gammacarboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristolilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, fenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, “Proteins - Structure And Molecular Properties, II Ed, T. E. Creighton, W. H. Freeman y colaboradores, Nueva York: (1993); “Posttranslational Covalent Modification of Proteins”, B. C. Johnson, Ed, Academic Press, Nueva York, pp. 1-12 (1983); Seifler *et al.*, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

Los términos “fragmento”, “variante”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren a un antagonista de Sp35 de la presente revelación incluyen cualquier molécula antagonista que conserve al menos parte de la capacidad para inhibir la actividad de Sp35. Los antagonistas de Sp35 según lo descrito en la presente memoria pueden incluir un fragmento, una variante o moléculas derivadas de los mismos sin limitación, siempre y cuando el antagonista de Sp35 siga teniendo su función. Los polipéptidos Sp35 solubles de la presente revelación puede incluir fragmentos proteolíticos de Sp35, fragmentos de eliminación y, en concreto, fragmentos que alcancen más fácilmente el sitio de acción cuando se administran a un animal. Los fragmentos de polipéptido incluyen además cualquier porción del polipéptido que comprenda un epítomo antigénico o inmunógeno del polipéptido nativo, incluyendo epítomos lineales, así como tridimensionales. Los polipéptidos Sp35 solubles de la presente revelación pueden comprender variantes de regiones de Sp35, incluyendo fragmentos según lo descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos modificadas debido a las sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales, tales como una variante alélica. La expresión “variante alélica” pretende significar formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma dado de un organismo. “Genes II”, Leswin, B., ed, John Wiley & Sons, Nueva York (1985). Se pueden producir variantes no naturales mediante técnicas de mutagénesis conocidas en la materia. Los polipéptidos Sp35 solubles pueden comprender sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los antagonistas de Sp35 de la presente revelación también pueden incluir moléculas derivadas. Por ejemplo, los polipéptidos Sp35 de la presente revelación pueden incluir regiones de Sp35 que hayan sido modificadas para presentar características adicionales no encontradas en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión y conjugados proteicos.

En la presente revelación, un “fragmento de polipéptido” se refiere a una secuencia corta de aminoácidos de un

polipéptido Sp35. Los fragmentos de proteína pueden ser "independientes" o estar comprendidos en un polipéptido mayor del que el fragmento forma parte de la región. Los ejemplos representativos de los fragmentos de polipéptido de la revelación incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos y aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

Anticuerpo o inmunoglobulina. En un ejemplo, los antagonistas de Sp35 para su uso en los procedimientos de tratamiento revelados en la presente memoria son moléculas de "anticuerpo" o de "inmunoglobulina", o fragmentos inmuno-específicos de las mismas, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o de inmunoglobulina naturales o moléculas de anticuerpo diseñadas genéticamente o fragmentos que se unen a antígenos de una manera similar a las moléculas de anticuerpo. En la presente memoria, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente. Un anticuerpo o una inmunoglobulina comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada y, normalmente, comprenden al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas de los sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, II ed. 1988).

Como se tratará más detalladamente más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende cinco clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Las cinco clases pertenecen claramente al ámbito de la revelación, estando la siguiente información dirigida en general a la clase de IgG de las moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están comúnmente unidas mediante enlaces de tipo disulfuro en una configuración "Y", en la que las cadenas ligeras soportan a las cadenas pesadas partiendo de la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas se dividen en regiones de una homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de tanto cadena ligera (V_L) como cadena pesada (V_H) determinan el reconocimiento de y la especificidad hacia los antígenos. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (C_L) y la cadena pesada (C_{H1} , C_{H2} o C_{H3}) confieren importantes propiedades biológicas tales como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor Fc, la unión de complementos y similares. Por norma, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se van distanciando del sitio de unión al antígeno o del terminal amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios C_{H3} y C_L comprenden realmente el terminal carboxilo de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o como lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida bien a la cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las partes de la "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces covalentes de tipo disulfuro o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas bien por hibridomas, linfocitos B o células huésped diseñadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N-terminal en los extremos ahorquillados de la configuración Y hasta el extremo C-terminal en el fondo de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena determinar la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren una especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles por el experto en la técnica en vistas de la presente revelación y, por consiguiente, pertenecen al ámbito de la presente revelación.

Como se indica anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos de antígenos. Es decir, el dominio V_L y el dominio V_H de un anticuerpo se combinan, formando la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en cada una de las cadenas V_H y V_L . En algunos casos, por ejemplo, en ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas genéticamente en base a las inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir únicamente en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature*, 363:446-448 (1993).

En anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias de aminoácidos cortas no contiguas que se sitúan específicamente para formar el dominio de unión al antígeno cuando el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos de los dominios de unión al antígeno, denominados regiones "marco", muestran una menor variabilidad inter-molecular. Las regiones marco adoptan, en gran medida, una configuración

de lámina β y las CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Así pues, las regiones marco actúan para formar un andamio que hace posible la colocación de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre las cadenas. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR colocadas define una superficie complementaria para el epítipo del antígeno inmunorreactivo.

5 Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo con su epítipo análogo. Cualquier experto en la técnica puede identificar con facilidad los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, para cualquier región variable de cadena pesada o de cadena ligera, ya que se han definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., *et al.*, Departamento de EE.UU. de Salud y Asuntos Sociales (1983) y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987).

10 En las especies de camélidos, sin embargo, la región variable de la cadena pesada, conocida como V_{HH} , forma toda la CDR. Las principales diferencias entre las regiones variables V_{HH} de los camélidos y aquellas derivadas de anticuerpos convencionales (V_H) incluyen (a) aminoácidos más hidrófobos en la superficie de contacto de la cadena ligera de V_H , en comparación con la región correspondiente de V_{HH} ; (b) una CDR3 más larga en V_{HH} ; y (c) la frecuente aparición de un enlace de tipo disulfuro entre la CDR1 y la CDR3 de V_{HH} .

15 En un ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos cinco CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la revelación comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo. Los ejemplos de moléculas de anticuerpos que comprenden al menos una CDR que se pueden incluir en las presentes moléculas de unión al antígeno son conocidos en la técnica, y en la presente memoria se describen moléculas ejemplares.

25 Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para su uso en los procedimientos de la revelación incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por disulfuro (scFv), fragmentos que comprenden bien un dominio V_L o un dominio V_H , fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos anti-Id contra moléculas de unión descritos en la presente memoria). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la revelación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

35 Los fragmentos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la/s región/es variable/s solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} . También se incluyen en la revelación fragmentos de unión al antígeno que también comprenden cualquier combinación de una o varias regiones variables con una región bisagra, dominios C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para uso en los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otro ejemplo, la región variable puede ser de condrictios (por ejemplo, proceder de los tiburones). Como se usa en la presente memoria, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados de bancos de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en, la patente estadounidense n.º 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio C_{H1} , un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio C_{H2} , un dominio C_{H3} , o una variante o un fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión puede comprender una cadena de polipéptido que comprenda un dominio C_{H1} ; una cadena de polipéptido que comprenda un dominio C_{H1} , al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio C_{H2} ; una cadena de polipéptido que comprenda un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3} ; una cadena de polipéptido que comprenda un dominio C_{H1} , al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio C_{H3} o una cadena de polipéptido que comprenda un dominio C_{H1} , al menos una parte de un dominio bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} . En otro ejemplo, un polipéptido de la revelación comprende una cadena de polipéptido que comprende un dominio C_{H3} . Además, un polipéptido de unión puede carecer de al menos una porción de un dominio C_{H2} (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio C_{H2}). Como se establece anteriormente, el experto habitual en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) se pueden modificar de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

60 En ciertos anticuerpos antagonistas de Sp35 o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para su uso en los

procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria, las porciones de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen las porciones de cadena pesada no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a la diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo

5

biespecífico.

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de unión para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria se pueden obtener de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio C_H1 derivado de una molécula de IgG₁ y una región bisagra derivada de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena

10

pesada puede comprender una región de bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₄.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferentemente, la porción de cadena ligera comprende al

15

menos uno entre un dominio V_L o C_L.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de cadena pesada o una porción de la cadena ligera de inmunoglobulina) se puede crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones

20

de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácido no esenciales.

Los anticuerpos o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la revelación. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquéllas con una constante de disociación o K_d inferior a 5 x 10⁻²M, 10⁻²M, 5 x 10⁻³M, 10⁻³M, 5 x 10⁻⁴M, 10⁻⁴M, 5 x 10⁻⁵M, 10⁻⁵M, 5 x 10⁻⁶M, 10⁻⁶M, 5 x 10⁻⁷M, 10⁻⁷M, 5 x 10⁻⁸M, 10⁻⁸M, 5 x 10⁻⁹M, 10⁻⁹M, 5 x 10⁻¹⁰M, 10⁻¹⁰M, 5 x 10⁻¹¹M, 10⁻¹¹M, 5 x 10⁻¹²M, 10⁻¹²M, 5 x 10⁻¹³M, 10⁻¹³M, 5 x 10⁻¹⁴M, 10⁻¹⁴M, 5 x 10⁻¹⁵M o 10⁻¹⁵M.

25

Los anticuerpos o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria actúan como antagonistas de Sp35 como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, un anticuerpo puede funcionar como antagonista, bloqueando o inhibiendo la actividad supresora del polipéptido Sp35.

30

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo quimérico" se empleará para referirse a cualquier anticuerpo en el que la región o el sitio inmunorreactivo se obtenga o derive de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada) se obtenga de una segunda especie. En los ejemplos preferidos, la región o el sitio de unión a la diana tendrán un origen no humano (por ejemplo, de ratón o primate) y la región constante será humana.

35

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo diseñado genéticamente" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable, ya sea de la cadena pesada o de la cadena ligera o de ambas, está modificado mediante al menos la sustitución parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, mediante la sustitución parcial de la región marco y el cambio secuencial. Aunque las CDR pueden proceder de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del cual se hayan obtenido las regiones marco, se prevé que las CDR procederán de un anticuerpo de clase diferente y, preferentemente, de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo diseñado genéticamente que tiene una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida injertadas en una región marco de la cadena pesada o ligera se denomina en la presente memoria "anticuerpo humanizado". Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR por las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que sólo haya que transferir los residuos que sean necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a la diana. Teniendo en cuenta las explicaciones expuestas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762 y 6.180.370, será competencia de los expertos en la técnica, bien mediante la realización de la experimentación de rutina o mediante ensayo y pruebas de error, obtener un anticuerpo funcional diseñado genéticamente o humanizado.

40

45

50

Como se usan en la presente memoria, los términos "ligado", "fusionado" o "fusión" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier procedimiento, entre los que se incluyen la conjugación química o los procedimientos recombinantes. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, de una manera que mantenga el marco de lectura correcto de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una sola proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos, normalmente, no están unidos de ese modo en la naturaleza). Aunque el

55

marco de lectura se hace así continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar física o espacialmente separados por, por ejemplo, una secuencia ligadora en marco.

En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo, en el que los residuos que son vecinos entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

El término "expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a un procedimiento mediante el cual un gen produce un elemento bioquímico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. El procedimiento incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, la desactivación de genes, así como tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Se incluye sin limitación la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN en horquilla pequeño (ARNhp), ARN de interferencia pequeño (ARNip) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en polipéptido/s. Si el producto final deseado es un elemento bioquímico, la expresión incluye la creación de elementos bioquímicos y cualquier precursor.

Los términos "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" pretenden significar cualquier sujeto, particularmente, un sujeto mamífero, para el que se desee un diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Los sujetos mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales de deporte, animales de compañía tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates, tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos, tales como caballos, burros y cebras; animales para la producción de alimentos tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, y así sucesivamente. En ciertos casos, el mamífero es un sujeto humano.

La expresión "interferencia de ARN" o "ARNi" se refiere al silenciamiento o disminución de la expresión génica por parte de ARNip. Se trata del procedimiento de silenciamiento génico post-transcripcional específico de la secuencia en animales y plantas, iniciado por ARNip que es homólogo en su región dúplex a la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno al organismo, estar integrado en un cromosoma o presente en un vector de transfección que no esté integrado en el genoma. La expresión del gen es inhibida bien completa o parcialmente. También se puede considerar que el ARNi inhibe la función de un ARN diana; la función del ARN diana puede ser completa o parcial.

Sp35 (LINGO-1/LRRN6)

La revelación se basa en el descubrimiento de que los antagonistas de Sp35 aumentan el número de oligodendrocitos mediante la potenciación de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación. Además, los inventores han descubierto que los antagonistas de Sp35 potencian la mielinización de las neuronas. Sin pretender estar limitado por la teoría, parece que la actividad promotora de la mielinización producida por los antagonistas de Sp35 es independiente de los efectos sobre la proliferación de los oligodendrocitos.

La Sp35 humana natural es una proteína específica del sistema nervioso glicosilado que consiste en 614 aminoácidos (Fig. 1, SEC ID N.º 2). El polipéptido Sp35 humano contiene un dominio LRR que consiste en 14 repeticiones ricas en leucina (incluyendo los casquetes N- y C-terminales), un dominio Ig, una región transmembrana y un dominio citoplasmático (Figura 2). El dominio citoplasmático contiene un sitio de fosforilación de la tirosina canónico. Además, la proteína Sp35 de origen natural contiene una secuencia señal, una región básica corta entre LRRCT y el dominio Ig, y una región transmembrana entre el dominio Ig y el dominio citoplasmático (Figura 2). El gen de Sp35 humano contiene codones de inicio de la traducción alternativos, de modo que seis aminoácidos adicionales (MQVSKR; SEC ID N.º 5) pueden o no estar presentes en el extremo N-terminal de la secuencia señal de Sp35. La Tabla 1 enumera los dominios de Sp35 y otras regiones, de acuerdo con el número de residuos de aminoácidos, en base a la secuencia en la FIG. 1.

Tabla 1

Dominio o Región	Residuo inicial	Residuo final
Secuencia señal	1	33 ó 35
LRRNT	34 ó 36	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRU.	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	414 ó 416
Básico	415 ó 417	424
Ig	419	493
Secuencia conectora	494	551
Transmembrana	552	576
Citoplasmático	577	614

La distribución tisular y la expresión del desarrollo de Sp35 se han estudiado en seres humanos y ratas. La biología de Sp35 se ha estudiado en un modelo de experimentación animal (rata). La expresión de Sp35 de rata se localiza en las neuronas del sistema nervioso y los oligodendrocitos del cerebro, según lo determinado mediante transferencia Northern y tinción inmuno-histoquímica. El nivel de expresión del ARNm de Sp35 de rata se regula evolutivamente, con un pico poco después del nacimiento, es decir, aproximadamente un día después del nacimiento. En un modelo de lesión por transección de la médula espinal de rata, Sp35 es sobreexpresada en la zona de la lesión, según lo determinado mediante RT-PCR. Además, se ha demostrado que Sp35 interactúa con el receptor Nogo66 (receptor Nogo). Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2004/00832. Sin embargo, el receptor Nogo 1 no se expresa en los oligodendrocitos, y cualquier impacto de Sp35 en la biología de los oligodendrocitos debe ser por una vía independiente del receptor Nogo.

Uso médico de los antagonistas de Sp35

Un ejemplo de la presente revelación proporciona procedimientos para tratar una enfermedad, un trastorno o una lesión asociados con la dismielinización o la desmielinización, por ejemplo, esclerosis múltiple, en un animal que padece dicha enfermedad, procedimiento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en administrar al animal una cantidad eficaz de un antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo contra Sp35 y un polinucleótido antagonista de Sp35.

Además, la revelación se dirige a un procedimiento para potenciar la mielinización de las neuronas en un mamífero, que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo

contra Sp35 y un polinucleótido antagonista de Sp35.

Un ejemplo adicional de la presente revelación proporciona procedimientos para tratar una enfermedad, un trastorno o una lesión asociados con la muerte o la falta de diferenciación de los oligodendrocitos, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, leucodistrofia de células globoides (enfermedad de Krabbe), en un animal que padece dicha enfermedad, procedimiento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en administrar al animal una cantidad eficaz de un antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo contra Sp35 y un polinucleótido antagonista de Sp35.

Otro aspecto de la revelación incluye un procedimiento para potenciar la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de los oligodendrocitos en un mamífero, que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo contra Sp35 y un polinucleótido antagonista de Sp35.

Un antagonista de Sp35, por ejemplo, un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo contra Sp35 o un polinucleótido antagonista de Sp35, para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria se puede preparar y usar como agente terapéutico que detenga, reduzca, prevenga o inhiba la capacidad de Sp35 para regular negativamente la mielinización de las neuronas por parte de los oligodendrocitos. Además, el antagonista de Sp35 para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria se puede preparar y usar como un agente terapéutico que detenga, reduzca, prevenga o inhiba la capacidad de Sp35 para regular negativamente la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de los oligodendrocitos .

Otros ejemplos de la revelación incluyen un procedimiento para inducir la proliferación o la supervivencia de los oligodendrocitos para tratar una enfermedad, un trastorno o una lesión que implique la destrucción de los oligodendrocitos o de la mielina, que comprende administrar a un mamífero, en o cerca de la zona de la enfermedad, trastorno o lesión, una cantidad suficiente para reducir la inhibición de la extensión axonal y promover la mielinización.

En los procedimientos de la presente revelación, un antagonista de Sp35 se puede administrar mediante la administración directa de un polipéptido Sp35 soluble, un anticuerpo contra Sp35 o un polinucleótido antagonista de Sp35 al paciente. Alternativamente, el antagonista de Sp35 se puede administrar a través de un vector de expresión que produzca el antagonista de Sp35 específico. En ciertos ejemplos de la revelación, un antagonista de Sp35 se administra en un procedimiento de tratamiento que incluye: (1) transformar o transfectar una célula huésped implantable con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que exprese un antagonista de Sp35; y (2) implantar la célula huésped transformada en un mamífero, en la zona de una enfermedad, un trastorno o una lesión. Por ejemplo, la célula huésped transformada se puede implantar en la zona de una lesión crónica de EM. En algunos ejemplos de la revelación, la célula huésped implantable se retira de un mamífero, se cultiva temporalmente, se transforma o se transfecta con un ácido nucleico aislado que codifique un antagonista de Sp35, y se vuelve a implantar de nuevo en el mismo mamífero del que se ha retirado. La célula se puede retirar, pero no necesariamente, del mismo sitio en el que se implante. Dichos ejemplos, a veces conocidos como terapia génica *ex vivo*, pueden proporcionar un suministro continuo del antagonista de Sp35, ubicado en el sitio de acción, durante un período limitado de tiempo.

Las enfermedades o los trastornos que se pueden tratar o mejorar mediante los procedimientos de la presente revelación incluyen enfermedades, trastornos o lesiones que se refieran a la dismielinización o desmielinización de las neuronas de mamíferos. Específicamente, enfermedades y trastornos en los que la mielina que rodea la neurona bien esté ausente, sea incompleta, no esté formada correctamente o se esté deteriorando. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple (EM), incluyendo las formas de recaídas y remitentes progresiva secundaria y progresiva primaria de la EM; leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), encefalomiелitis (EPL), mielosis central pontina (MCP), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia de células globoides (enfermedad de Krabbe), degeneración de Wallerian, neuritis óptica y mielitis transversa.

Las enfermedades o los trastornos que se pueden tratar o mejorar mediante los procedimientos de la presente revelación incluyen enfermedades, trastornos o lesiones que se refieren a la muerte, o la falta de proliferación o diferenciación de los oligodendrocitos. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple (EM), leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), encefalomiелitis (EPL), mielosis central pontina (MCP), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia de células globosas (enfermedad de Krabbe) y degeneración de Wallerian.

Las enfermedades o los trastornos que se pueden tratar o mejorar mediante los procedimientos de la presente revelación incluyen enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

Los ejemplos de otras enfermedades, trastornos o lesiones que se pueden tratar o mejorar con los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, lesiones de la médula espinal, mielopatía o rediculopatía

crónica, lesión cerebral traumática, enfermedad de las neuronas motoras, ruptura axonal, contusiones, parálisis, daño por radiación u otras complicaciones neurológicas de la quimioterapia, apoplejía, lagunas importantes obstrucción de los vasos de tamaño medio a grande, leucoaraiosis, neuropatía óptica isquémica aguda, deficiencia de vitamina E (síndrome de deficiencia aislado, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig), deficiencia de B12, de B6 (piridoxina-pelagra), de tiamina, de folato, de ácido nicotínico, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia del trigémino, parálisis de Bell o cualquier daño neuronal que requiera la regeneración axonal, la remielinización, o la supervivencia o diferenciación y/o proliferación de los oligodendrocitos.

Polipéptidos Sp35 solubles

Los antagonistas de Sp35 de la presente revelación incluyen aquellos polipéptidos que bloquean, inhiben o interfieren en la función biológica de Sp35 de origen natural. Específicamente, los polipéptidos Sp35 solubles de la presente revelación incluyen fragmentos, variantes o sus derivados de un polipéptido Sp35 soluble. La Tabla 1 anterior describe los diversos dominios del polipéptido Sp35. Los polipéptidos Sp35 solubles carecen de los dominios intracelular y transmembrana del polipéptido Sp35. Por ejemplo, ciertos polipéptidos Sp35 solubles carecen de los aminoácidos 552-576, que comprenden el dominio transmembrana de Sp35 y/o de los aminoácidos 577-614, que comprenden el dominio intracelular de Sp35. Además, ciertos polipéptidos Sp35 solubles comprenden los dominios LRR, dominio Ig, la región básica y/o el dominio extracelular completo (correspondiente a los aminoácidos 34 a 532 de la SEC ID N.º 2) del polipéptido Sp35. Como apreciaría el experto en la técnica, el dominio extracelular completo de Sp35 puede comprender más o menos aminoácidos bien en el extremo C-terminal o extremo N-terminal del polipéptido del dominio extracelular. Como tales, los polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 41 a 525 de la SEC ID N.º 2; 40 a 526 de la SEC ID N.º 2; 39 a 527 de la SEC ID N.º 2; 38 a 528 de la SEC ID N.º 2; 37 a 529 de la SEC ID N.º 2; 36 a 530 de la SEC ID N.º 2; 35 a 531 de la SEC ID N.º 2; 34 a 531 de la SEC ID N.º 2; 46 a 520 de la SEC ID N.º 2; 45 a 521 de la SEC ID N.º 2; 44 a 522 de la SEC ID N.º 2; 43 a 523 de la SEC ID N.º 2, y 42 a 524 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Los antagonistas de los polipéptidos Sp35 pueden incluir cualquier combinación de dominios según lo descrito en la Tabla 1.

Los polipéptidos Sp35 solubles adicionales para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 1 a 33 de la SEC ID N.º 2; 1 a 35 de la SEC ID N.º 2; 34 a 64 de la SEC ID N.º 2; 36 a 64 de la SEC ID N.º 2; 66 a 89 de la SEC ID N.º 2; 90 a 113 de la SEC ID N.º 2; 114 a 137 de la SEC ID N.º 2; 138 a 161 de la SEC ID N.º 2; 162 a 185 de la SEC ID N.º 2; 186 a 209 de la SEC ID N.º 2; 210 a 233 de la SEC ID N.º 2; 234 a 257 de la SEC ID N.º 2; 258 a 281 de la SEC ID N.º 2; 282 a 305 de la SEC ID N.º 2; 306 a 329 de la SEC ID N.º 2; 330 a 353 de la SEC ID N.º 2; 363 a 416 de la SEC ID N.º 2; 417 a 424 de la SEC ID N.º 2; 419 a 493 de la SEC ID N.º 2; y 494 a 551 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Otros polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 1 a 33 de la SEC ID N.º 2; 1 a 35 de la SEC ID N.º 2; 1 a 64 de la SEC ID N.º 2; 1 a 89 de la SEC ID N.º 2; 1 a 113 de la SEC ID N.º 2; 1 a 137 de la SEC ID N.º 2; 1 a 161 de la SEC ID N.º 2; 1 a 185 de la SEC ID N.º 2; 1 a 209 de la SEC ID N.º 2; 1 a 233 de la SEC ID N.º 2; 1 a 257 de la SEC ID N.º 2; 1 a 281 de la SEC ID N.º 2; 1 a 305 de la SEC ID N.º 2; 1 a 329 de la SEC ID N.º 2; 1 a 353 de la SEC ID N.º 2; 1 a 416 de la SEC ID N.º 2; 1 a 424 de la SEC ID N.º 2; 1 a 493 de la SEC ID N.º 2; 1 a 551 de la SEC ID N.º 2; 1 a 531 de la SEC ID N.º 2 y 1 a 532 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Otros polipéptidos Sp35 solubles más para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 34 a 64 de la SEC ID N.º 2; 34 a 89 de la SEC ID N.º 2; 34 a 113 de la SEC ID N.º 2; 34 a 137 de la SEC ID N.º 2; 34 a 161 de la SEC ID N.º 2; 34 a 185 de la SEC ID N.º 2; 34 a 209 de la SEC ID N.º 2; 34 a 233 de la SEC ID N.º 2; 34 a 257 de la SEC ID N.º 2; 34 a 281 de la SEC ID N.º 2; 34 a 305 de la SEC ID N.º 2; 34 a 329 de la SEC ID N.º 2; 34 a 353 de la SEC ID N.º 2; 34 a 416 de la SEC ID N.º 2; 34 a 424 de la SEC ID N.º 2; 34 a 493 de la SEC ID N.º 2, y 34 a 551 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Más polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 34 a 530 de la SEC ID N.º 2; 34 a 531 de la SEC ID N.º 2; 34 a 532 de la SEC ID N.º 2; 34 a 533 de la SEC ID N.º 2; 34 a 534 de la SEC ID N.º 2; 34 a 535 de la SEC ID N.º 2; 34 a 536 de la SEC ID N.º 2; 34 a 537 de la SEC ID N.º 2; 34 a 538 de la SEC ID N.º 2; 34 a 539 de la SEC ID N.º 2; 30 a 532 de la SEC ID N.º 2; 31 a 532 de la SEC ID N.º 2; 32 a 532 de la SEC ID N.º 2; 33 a 532 de la SEC ID N.º 2; 34 a 532 de la SEC ID N.º 2; 35 a 532 de la SEC ID N.º 2; 36 a 532 de la SEC ID N.º 2; 30 a 531 de la SEC ID N.º 2; 31 a 531 de la SEC ID N.º 2; 32 a 531 de la SEC ID N.º 2; 33 a 531 de la SEC ID N.º 2; 34 a 531 de la SEC ID N.º 2; 35 a 531 de SEC ID N.º 2, y 36 a 531 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Otros polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos

36 a 64 de la SEC ID N.º 2; 36 a 89 de la SEC ID N.º 2; 36 a 113 de la SEC ID N.º 2; 36 a 137 de la SEC ID N.º 2; 36 a 161 de la SEC ID N.º 2; 36 a 185 de la SEC ID N.º 2; 36 a 209 de la SEC ID N.º 2; 36 a 233 de la SEC ID N.º 2; 36 a 257 de la SEC ID N.º 2; 36 a 281 de la SEC ID N.º 2; 36 a 305 de la SEC ID N.º 2; 36 a 329 de la SEC ID N.º 2; 36 a 353 de la SEC ID N.º 2; 36 a 416 de la SEC ID N.º 2; 36 a 424 de la SEC ID N.º 2; 36 a 493 de la SEC ID N.º 2, y 36 a 551 de la SEC ID N.º 2 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Más polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 36 a 530 de la SEC ID N.º 2; 36 a 531 de la SEC ID N.º 2; 36 a 532 de la SEC ID N.º 2; 36 a 533 de la SEC ID N.º 2; 36 a 534 de la SEC ID N.º 2; 36 a 535 de la SEC ID N.º 2; 36 a 536 de la SEC ID N.º 2; 36 a 537 de la SEC ID N.º 2; 36 a 538 de la SEC ID N.º 2, y 36 a 539 de la SEC ID N.º 2, o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Otros polipéptidos Sp35 solubles, fragmentos, variantes o derivados de los mismos incluyen polipéptidos que comprenden el dominio Ig de Sp35. Por ejemplo, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 417 a 493 de la SEC ID N.º 2; 417 a 494 de la SEC ID N.º 2; 417 a 495 de la SEC ID N.º 2; 417 a 496 de la SEC ID N.º 2; NO 417 a 497 de la SEC ID N.º 2; 417 a 498 de la SEC ID N.º 2; 417 a 499 de la SEC ID N.º 2; 417 a 500 de la SEC ID N.º 2; 417 a 492 de la SEC ID N.º 2; 417 a 491 de la SEC ID N.º 2; 412 a 493 de la SEC ID N.º 2; 413 a 493 de la SEC ID N.º 2; 414 a 493 de la SEC ID N.º 2; 415 a 493 de la SEC ID N.º 2; 416 a 493 de la SEC ID N.º 2; 411 a 493 de la SEC ID N.º 2; 410 a 493 de la SEC ID N.º 2; n ° 410 a 494 de la SEC ID N.º 2; 411 a 494 de la SEC ID N.º 2; 412 a 494 de la SEC ID N.º 2; 413 a 494 de la SEC ID N.º 2; 414 a 494 de la SEC ID N.º 2; 415 a 494 de la SEC ID N.º 2; 416 a 494 de la SEC ID N.º 2; 417 a 494 de la SEC ID N.º 2, y 418 a 494 de la SEC ID N.º 2, o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos.

Más polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en péptidos del dominio Ig de sp35 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las siguientes secuencias polipeptídicas: ITX₁X₂X₃ (SEC ID N.º 6), ACX₁X₂X₃ (SEC ID N.º 7), VCX₁X₂X₃ (SEC ID N.º 8) y SPX₁X₂X₃ (SEC ID N.º 9), en las que X₁ es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, X₂ es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina y X₃ es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina. Por ejemplo, los péptidos antagonistas de dominio Ig de Sp35 incluyen un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en las siguientes secuencias polipeptídicas: SPRKH (SEC ID N.º 10), SPRKK (SEC ID N.º 11), SPRKR (SEC ID N.º 12), SPKKH (SEC ID N.º 13), SPHKH (SEC ID N.º 14), SPRRH (SEC ID N.º 15), SPRHH (SEC ID N.º 16), SPRRR (SEC ID N.º 17), SPHHH (SEC ID N.º 18), SPKKK (SEC ID N.º 19), LSPRKH (SEC ID N.º 61), LSPRKK (SEC ID N.º _), LSPRKR (SEC ID N.º _), LSPKKH (SEC ID N.º _), LSPHKH (SEC ID N.º _), LSPRRH (SEC ID N.º _), LSPRHH (SEC ID N.º _), LSPRRR (SEC ID N.º _), LSPHHH (SEC ID N.º _), LSPKKK (SEC ID N.º _), WLSPRKH (SEC ID N.º _), WLSPRKK (SEC ID N.º _), WLSPRKR (SEC ID N.º _), WLSPKKH (SEC ID N.º _), WLSPHKH (SEC ID N.º _), WLSPRRH (SEC ID N.º _), WLSPRRR (SEC ID N.º _), WLSPHHH (SEC ID N.º _), WLSPKKK (SEC ID N.º _). Estos polipéptidos Sp35 solubles incluyen el "bucle RKH" básico (aminoácidos 456-458 de arginina-lisina-histidina) en el dominio Ig de Sp35. Se cree que este tripéptido básico es importante para la unión del polipéptido antagonista de Sp35 soluble con el polipéptido Sp35 nativo. Otros polipéptidos Sp35 solubles adicionales que incluyen un tripéptido básico son ITPKRR (SEC ID N.º 20), ACHHK (SEC ID N.º 21) y VCHHK (SEC ID N.º 22).

Más polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en péptidos del dominio Ig de sp35, o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, péptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste de las siguientes secuencias polipeptídicas: X₄X₅RKH (SEC ID N.º 23), X₄X₅RRR (SEC ID N.º 24), X₄X₅KK (SEC ID N.º 25), X₄X₅HHH (SEC ID N.º 26), X₄X₅RKK (SEC ID N.º 27), X₄X₅RKR (SEC ID N.º 28), X₄X₅KKH (SEC ID N.º 29), X₄X₅HKH (SEC ID N.º 30), X₄X₅RRH (SEC ID N.º 31) y X₄X₅RHH (SEC ID N.º 32), en las que X₄ es cualquier aminoácido y X₅ es cualquier aminoácido.

En otros ejemplos, los polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en péptidos del dominio Ig de Sp35, o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten de las siguientes secuencias polipeptídicas: ITX₆X₇X₈ (SEC ID N.º 68), ACX₆X₇X₈ (SEC ID N.º 69), VCX₆X₇X₈ (SEC ID N.º 70) y SPX₆X₇X₈ (SEC ID N.º 71), en las que X₆ es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, X₇ es cualquier aminoácido y X₈ es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina. Por ejemplo, los péptidos antagonistas de dominio Ig de Sp35 incluyen un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia polipeptídica: SPRLH (SEC ID N.º 72).

En otros ejemplos de la presente revelación, los polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en péptidos que contienen los aminoácidos 452-458 del dominio Ig de Sp35, o derivados de los mismos, en los que el aminoácido 452 es un residuo de triptófano o fenilalanina.

Más polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación incluyen un polipéptido

Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en péptidos de la base de dominio básico de Sp35. Específicamente, péptidos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las siguientes secuencias polipeptídicas: RRARIRDRK (SEC ID N.º 33), KKVKEKEK (SEC ID N.º 34), RRLRLDRK (SEC ID N.º 35), RRGRDRK (SEC ID N.º 36) y RRIRARDRK (SEC ID N.º 37).

- 5 Varios polipéptidos Sp35 solubles, y procedimientos y materiales ejemplares para la obtención de estas moléculas para la práctica de la presente revelación se describen a continuación y/o se pueden encontrar, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional N.º PCT/LTS2004/008323.

Los polipéptidos Sp35 solubles para uso en los procedimientos de la presente revelación descritos en la presente memoria pueden ser cíclicos. La ciclación de los polipéptidos Sp35 solubles reduce la libertad configuracional de los péptidos lineales y genera una molécula más restringida estructuralmente. Hay muchos procedimientos de ciclación de péptidos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la ciclación "de estructura principal a estructura principal" mediante la formación de un enlace de tipo amida entre los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal y el extremo C-terminal del péptido. El procedimiento de ciclación "de estructura principal a estructura principal" incluye la formación de puentes disulfuro entre dos residuos de aminoácidos ω -thio (por ejemplo, cisteína, homocisteína).

10 Ciertos polipéptidos Sp35 solubles de la presente revelación incluyen modificaciones en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del péptido para formar un polipéptido Sp35 cíclico. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones a residuos de cisteína, residuos de cisteína acetilados, residuos de cisteína con un resto NH_2 y biotina. Otros procedimientos de ciclación de péptidos se describen en Li y Roller. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 325-341 (2002).

20 Los polipéptidos Sp35 cíclicos para su uso en los procedimientos de la presente revelación descrita en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, $\text{C}_1\text{LSPX}_9\text{X}_{10}\text{X}_{11}\text{C}_2$ (SEC ID N.º ___) en la que X_1 es lisina, arginina, histidina, glutamina, asparagina o, X_2 es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, X_3 es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, C_1 tiene opcionalmente un resto de promover la ciclación (por ejemplo, un grupo acetilo o biotina) unido y C_2 tiene opcionalmente un resto para promover la ciclación (por ejemplo, un resto NH_2) unido.

25 Los polipéptidos Sp35 solubles descritos en la presente memoria pueden tener diversas alteraciones tales como sustituciones, inserciones o eliminaciones. Por ejemplo, las sustituciones incluyen, pero sin limitación, las siguientes sustituciones: valina de la posición 6 del polipéptido Sp35 de la SEC ID N.º 2 a metionina, serina de la posición 294 del polipéptido Sp35 de la SEC ID N.º 2 a glicina; valina de la posición 348 del polipéptido Sp35 de la SEC ID N.º 2 a alanina; arginina de la posición 419 del polipéptido Sp35 a histidina; arginina de la posición 456 a ácido glutámico e histidina de la posición 458 de la SEC ID N.º 2 a valina.

30

También se contemplan los fragmentos correspondientes de los polipéptidos Sp35 solubles al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticos a los polipéptidos de la SEC ID N.º 2 descritos en la presente memoria.

Como se sabe en la técnica, la "identidad secuencial" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se trata en la presente memoria, es posible determinar si cualquier polipéptido en particular es al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntico a otro polipéptido usando procedimientos y programas informáticos conocidos en la técnica tales como, pero sin limitación, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). El programa BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia en particular es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente revelación, los parámetros se establecen, por supuesto, de tal manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia del polipéptido de referencia y que se permiten huecos de homología de hasta el 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

35

40

45

Los polipéptidos Sp35 solubles para su uso en los procedimientos de la presente revelación pueden incluir cualquier combinación de dos o más polipéptidos Sp35 solubles.

Anticuerpos o fragmentos inmuno-específicos de los mismos

Los antagonistas de Sp35 para su uso en los procedimientos de la presente revelación también incluyen anticuerpos específicos de Sp35 o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados que son antagonistas de la actividad de Sp35. Por ejemplo, la unión de ciertos anticuerpos contra Sp35 a Sp35, tal como se expresa en los oligodendrocitos, bloquea la inhibición del crecimiento o la diferenciación de los oligodendrocitos, o bloquea la desmielinización o la dismielinización de las neuronas del SNC.

50

Ciertos anticuerpos antagonistas para su uso en los procedimientos descritos en la presente memoria específica o preferentemente se unen a un determinado fragmento o dominio del polipéptido Sp35. Dichos fragmentos de polipéptido Sp35 incluyen, pero sin limitación, un polipéptido Sp35 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417 (dominio LRR); 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (la región básica de Sp35), 417 a 424 (la región básica de Sp35), 417

55

a 493; 417 a 532; 419 a 493 (la región Ig de Sp35) o 425 a 532 de la SEC ID N.º 2, o una variante del polipéptido Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (la región básica de Sp35), 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (la región Ig de Sp35) o 425 a 532 de la SEC ID N.º 2.

- 5 Otros fragmentos de péptidos Sp35 adicionales a los que se unen ciertos anticuerpos específicos de Sp35 o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, aquellos fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en una o más repeticiones ricas en leucina (LRR) de Sp35. Dichos fragmentos incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en los aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 66 a 137; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329 o 330 a 353 de SEC ID N.º 2. También se contemplan los fragmentos correspondientes de una variante de polipéptido Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329 o 330 a 353 de la SEC ID N.º 2.

- 15 Otros fragmentos de péptido Sp35 a los que se unen ciertos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente revelación incluyen, pero sin limitación, aquellos fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en una o más regiones ricas en cisteína que flanquean la LRR de Sp35. Dichos fragmentos incluyen, por ejemplo, un fragmento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 34 a 64 de SEC ID N.º 2 (la región flanqueante LRR N-terminal (LRRNT)) o un fragmento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos 363 a 416 de la SEC ID N.º 2 (la región flanqueante LRR C-terminal (LRRCT)). También se contemplan los fragmentos correspondientes de una variante de polipéptido Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los aminoácidos 34 a 64 y 363 a 416 de SEC ID N.º 2.

- 25 En otros ejemplos, la presente revelación incluye un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo que se une específica o preferentemente a al menos un epítipo de Sp35, epítipo que comprende, consiste esencialmente en o consiste al menos en aproximadamente de cuatro a cinco aminoácidos de la SEC ID N.º 2, al menos siete, al menos nueve o entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos de la SEC ID N.º 2. Los aminoácidos de un determinado epítipo de la SEC ID N.º 2 según lo descrito pueden ser, pero no necesariamente, contiguos o lineales. En ciertos ejemplos, el al menos un epítipo de Sp35 comprende, consiste esencialmente en o consiste en un epítipo no lineal formado por el dominio extracelular de sp35 como se expresa en la superficie de una célula o como un fragmento soluble, por ejemplo, fusionado a una región Fc de IgG. Así pues, en ciertos casos, el al menos un epítipo de Sp35 comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30, o al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos contiguos o no contiguos de la SEC ID N.º 2, en la que los aminoácidos no contiguos forman un epítipo a través del plegamiento de proteínas.

- 35 En otros ejemplos, la presente revelación incluye un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo que se une específica o preferentemente a al menos un epítipo de Sp35, epítipo que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste además en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos contiguos o no contiguos de la SEC ID N.º 2 según lo descrito anteriormente, y un resto adicional que modifica la proteína, por ejemplo, se puede incluir un resto de carbohidrato de manera que el anticuerpo contra Sp35 se una con mayor afinidad a la proteína diana modificada de lo que lo hace con una versión no modificada de la proteína. Alternativamente, el anticuerpo contra Sp35 no se une con la versión no modificada de la proteína diana en absoluto.

- 45 En ciertos casos, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo de la revelación se une específicamente a al menos un epítipo de Sp35, o un fragmento o variante descrito anteriormente, es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado o aleatorio; se une preferentemente a al menos un epítipo de Sp35, o un fragmento o una variante descritos anteriormente, es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo homólogo o análogo similar relacionado; inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia que se une específica o preferentemente a un determinado epítipo de Sp35 o un fragmento o una variante descritos anteriormente; o se une a al menos un epítipo de Sp35, o un fragmento o una variante descritos anteriormente, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación K_D de menos de aproximadamente $5 \times 10^{-2}M$, aproximadamente $10^{-2}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-3}M$, aproximadamente $10^{-3}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-4}M$, aproximadamente $10^{-4}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-5}M$, aproximadamente $10^{-5}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-6}M$, aproximadamente $10^{-6}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-7}M$, aproximadamente $10^{-7}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-8}M$, aproximadamente $10^{-8}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-9}M$, aproximadamente $10^{-9}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-10}M$, aproximadamente $10^{-10}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-11}M$, aproximadamente $10^{-11}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-12}M$, aproximadamente $10^{-12}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-13}M$, aproximadamente $10^{-13}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-14}M$, aproximadamente $10^{-14}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-15}M$, aproximadamente $10^{-15}M$. En un aspecto particular, el anticuerpo o fragmento del mismo se une preferentemente a un polipéptido Sp35 humano o fragmento del mismo, en relación con un polipéptido Sp35 murino o fragmento del mismo.

Como se usa en el contexto de las constantes de disociación de la unión de los anticuerpos, el término "aproximadamente" permite el grado de variación inherente en los procedimientos utilizados para medir la afinidad de los anticuerpos. Por ejemplo, dependiendo del nivel de precisión de la instrumentación usada, del error estándar basado en el número de muestras medidas y del error de redondeo, la expresión "aproximadamente $10^2 M$ " podría incluir, por ejemplo, de 0,05M a 0,005M.

En determinados casos, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo de la revelación se une a polipéptidos Sp35, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una tasa de desactivación ($k(\text{off})$) de menos de o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-2} sec^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ o 10^{-3} sec^{-1} . Alternativamente, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo de la revelación se une a polipéptidos Sp35, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una tasa de desactivación ($k(\text{off})$) de menos de o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-4} sec^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-5} sec^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-6} sec^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ o 10^{-7} sec^{-1} .

En otros casos, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo de la revelación se une a polipéptidos Sp35, o fragmentos o variantes de los mismos, con una tasa de activación ($k(\text{on})$) de más de o igual a $10^3 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^3 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^4 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ o $5 \times 10^4 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Alternativamente, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado del mismo de la revelación se une a polipéptidos Sp35, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una tasa de activación ($k(\text{on})$) mayor de o igual a $10^5 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^5 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^6 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ o $5 \times 10^6 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ o $10^6 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

En un ejemplo, un antagonista de Sp35 para su uso en los procedimientos de la revelación es una molécula de anticuerpo o un fragmento inmuno específico del mismo. A menos que se indique específicamente, como se usa en la presente memoria, un "fragmento del mismo", en referencia a un anticuerpo se refiere a un fragmento inmuno específico, es decir, un fragmento específico del antígeno. En un ejemplo, un anticuerpo de la revelación es una molécula de unión biespecífica, un polipéptido de unión o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, minicuerpo, anticuerpo de dominio eliminado o proteína de fusión que tiene especificidad de unión por más de un epítipo, por ejemplo, más de un antígeno o más de un epítipo en el mismo antígeno. En un ejemplo, un anticuerpo biespecífico tiene al menos un dominio de unión específico de al menos un epítipo de Sp35. Un anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo tetravalente que tenga dos dominios de unión a la diana específicos de un epítipo de Sp35 y dos dominios de unión a la diana específicos de una segunda diana. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico tetravalente puede ser bivalente para cada especificidad.

Ciertos casos de la presente revelación comprenden la administración de un anticuerpo antagonista de Sp35 o un fragmento inmuno específico del mismo, en el que se han eliminado o modificado de otro modo al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como la reducción de las funciones efectoras, la capacidad de dimerizarse no covalentemente, el aumento de la capacidad de ubicarse en la zona de un tumor, menor semivida en suero o mayor semivida en suero en comparación con un anticuerpo completo, sin alteraciones de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria son anticuerpos de dominio eliminado que comprenden una cadena de polipéptido similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio entero de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio C_{H2} .

En ciertos anticuerpos antagonistas de Sp35 o fragmentos inmuno específicos de los mismos para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria, se puede mutar la porción Fc para disminuir la función efectora mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la eliminación o desactivación (a través de mutaciones puntuales o mediante otros procedimientos) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo circulante modificado, aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante según la presente revelación moderen la unión a complementos, reduciendo así la semivida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten mejorar la localización debido al aumento de la especificidad por el antígeno o de la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la semivida en suero, se pueden medir fácilmente y cuantificarse mediante técnicas inmunológicas ampliamente conocidas sin necesidad de realizar experimentación.

Las formas modificadas de los anticuerpos o fragmentos inmuno específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria pueden hacerse en anticuerpos primarios o precursores enteros mediante técnicas conocidas en la materia. En la presente memoria, se describen técnicas ejemplares con más detalle.

En ciertos casos, tanto la región variable como la región constante de los anticuerpos antagonistas de Sp35 o los fragmentos inmuno específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria son totalmente humanos. Los anticuerpos completamente humanos se pueden crear mediante técnicas que son conocidas en la materia y según lo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden

preparar anticuerpos totalmente humanos contra un antígeno específico mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir dichos anticuerpos como respuesta a la estimulación antigénica, pero cuyos loci endógenos hayan sido desactivados. En las patentes estadounidenses n.º 6.150.584; 6.458.592, 6.420.140, se describen técnicas ejemplares que se pueden usar para crear dichos anticuerpos. Se conocen otras técnicas en la materia. Asimismo, es posible producir anticuerpos totalmente humanos mediante diversas tecnologías de despliegue, por ejemplo, despliegue en fagos u otros sistemas de despliegue virales, según lo descrito más detalladamente en otra parte en la presente memoria.

Los anticuerpos antagonistas de Sp35 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria se pueden hacer o fabricar mediante técnicas que son conocidas en la materia. En ciertos casos, las moléculas de anticuerpo o los fragmentos de los mismos se "producen de forma recombinante", es decir, se producen mediante la tecnología de ADN recombinante. Más adelante, en la presente memoria, se describen ejemplos de técnicas para la fabricación de moléculas de anticuerpo o fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos antagonistas de Sp35 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria incluyen los derivados que están modificados, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo análogo. Por ejemplo, pero no a modo restrictivo, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ejemplos preferidos, un anticuerpo antagonista de Sp35 o fragmento inmuno-específico del mismo para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria no provocará una respuesta inmune perjudicial en el animal que se vaya a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En un ejemplo, Los anticuerpos antagonistas de Sp35 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria pueden modificarse para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, primatizados, desimmunógenos, o se pueden crear anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos se obtienen de un anticuerpo no humano, comúnmente, un anticuerpo murino o de primate, que conserve o conserve sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo precursor, pero que sea menos inmunógeno en seres humanos. Esto se puede realizar mediante diversos procedimientos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos enteros en las regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más regiones determinantes de la complementariedad no humanas (CDR) en un marco humano y regiones constantes, con o sin la conservación de los residuos marco fundamentales; o (c) transplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "envolviéndolos" con una sección similar a la humana mediante la sustitución de los residuos superficiales. Dichos procedimientos se describen en Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44: 65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994) y las patentes estadounidenses n.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762 y 6.190.370.

También se puede usar la desimmunización para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en la presente memoria, el término "desimmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar epítipos de linfocitos T (véanse, por ejemplo, los documentos W09852976A1, W00034317A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de partida y se crea un "mapa" de epítipos de linfocitos T humanos de cada región V que muestra la ubicación de los epítipos en relación con las regiones de determinación de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítipos de linfocitos T individuales del mapa de epítipos de linfocitos T se analizan para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de posibles secuencias V_H y V_L que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y, posteriormente, se incorporan estas secuencias a una serie de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos antagonistas de Sp35 o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria, cuya función es posteriormente analizada. Comúnmente, se generan y prueban entre 12 y 24 variantes de anticuerpos. Luego se clonan en vectores de expresión genes de las cadenas pesada y ligera completos que comprenden las regiones C humana y V modificadas, para introducir después los plásmidos en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. Luego se comparan los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

Los anticuerpos antagonistas de Sp35 o los fragmentos de los mismos para su uso en los procedimientos de la presente revelación se pueden generar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden producir mediante diversos procedimientos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede administrar un fragmento inmuno-específico de sp35 a diversos animales huésped, entre los que se incluyen, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contenga

anticuerpos policlonales específicos del antígeno. Se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, e incluyendo, pero sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también se conocen ampliamente en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, entre las que se incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de despliegue en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridomas incluyendo aquéllas conocidas en la materia y mostradas, por ejemplo, en Harlow et al., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, II ed. (1988); Hammerling *et al.*, en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", Elsevier, NY, 563-681 (1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de un único clon, incluyendo cualquier clon procarionta eucariota o de fago, y no al procedimiento mediante el cual se ha producido. Por lo tanto, la expresión "anticuerpo monoclonal" no se limita a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo el uso de la tecnología de hibridomas, recombinante y despliegue en fagos.

Mediante protocolos reconocidos en la técnica, en un ejemplo, se generan anticuerpos en mamíferos mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (por ejemplo, antígenos de Sp35 purificados o células o extractos celulares que comprenden dichos antígenos) y un adyuvante. Por lo común, esta inmunización provoca una respuesta inmune que comprende la producción de anticuerpos reactivos con los antígenos de esplenocitos o linfocitos activados. Aunque es posible recoger los anticuerpos resultantes del suero del animal para proporcionar preparaciones policlonales, a menudo es deseable aislar linfocitos individuales del bazo, los ganglios linfáticos o la sangre periférica para proporcionar preparaciones homogéneas de anticuerpos monoclonales (Acm). Preferentemente, los linfocitos se obtienen del bazo.

En este procedimiento ampliamente conocido (Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)), los linfocitos relativamente mortales de vida relativamente corta de un mamífero al que se ha inyectado el antígeno se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que sean tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente del linfocito B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas individuales mediante selección, dilución y nuevo crecimiento con cada cepa que comprende genes específicos de la formación de un único anticuerpo. Estos producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y se denominan "monoclonales" en referencia a su parentesco genético puro.

Los hibridomas así preparados se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, selección y crecimiento de los hibridomas que están disponibles comercialmente en una serie de proveedores, así como los protocolos estandarizados están ampliamente establecidos. Generalmente, se analiza la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado del medio de cultivo en el que se cultivan las células híbridas. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células híbridas se determina mediante ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o análisis inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA). Una vez identificadas las células híbridas que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarlos mediante procedimientos estándares (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, pp 59-103 (1986)). Además, se apreciará que es posible separar los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')₂ mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C_H1 de la cadena pesada.

Los expertos en la técnica también apreciarán que también se pueden obtener anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que codifican ADN (por ejemplo, sitios de unión al antígeno) de bancos de fagos de anticuerpos. En un ejemplo particular, se puede utilizar dicho fago para mostrar dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio o banco combinatorio de anticuerpos (por ejemplo, humano o murino). Se pueden seleccionar fagos que expresen un dominio de unión al antígeno que se una al antígeno de interés o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido a o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos procedimientos son comúnmente fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13

expresados del fago con dominios de anticuerpos Fv estabilizados con Fab, Fv o disulfuro de dominios fusionados recombinantemente bien con el gen de fago III o con la proteína del gen VIII. Por ejemplo, en el documento EP 368 684 B1; la patente estadounidense n.º 5.969.108; Hoogenboom, H. R. y Chames, *Immunol. Today* 21:371 (2000); Nagy *et al. Nat. Med.* 8: 801 (2002); Huie *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 2682 (2001); Lui *et al., J. Mol. Biol.* 315:1063 (2002), se presentan procedimientos ejemplares. Varias publicaciones (por ejemplo, Marks *et al., Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)) han descrito la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad mediante barajado de cadenas, así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para crear grandes bancos de fagos. En otro ejemplo, se puede usar el despliegue ribosómico para reemplazar los bacteriófagos como plataforma despliegue (véase, por ejemplo, Hanes *et al., Nat. Biotechnol.* 18:1287 (2000); Wilson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 3750 (2001); o Irving *et al., J. Immunol. Methods* 248:31 (2001)). En otro ejemplo más, se pueden rastrear bancos de superficie celular en busca de anticuerpos (Boder *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97: 10701 (2000); Daugherty *et al., J. Immunol. Methods*, 243:211 (2000)). Dichos procedimientos proporcionan alternativas a las técnicas de hibridomas tradicionales para el aislamiento y la posterior clonación de anticuerpos monoclonales.

En los procedimientos de despliegue en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican las regiones V_H y V_L se amplifican a partir de bancos de ADNc de animales (por ejemplo, bancos de ADNc humano o murino de tejidos linfoides) o bancos de ADNc sintéticos. En ciertos casos, los ADN que codifican las regiones V_H y V_L se unen mediante un ligador Fv_{mc} por PCR y se clonan en un vector fagémido (por ejemplo, pCANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se somete a electroporación en *E. coli* y se infecta *E. coli* con fago auxiliar. Los fagos usados en estos procedimientos son comúnmente fagos filamentosos, incluyendo fd y M13, y las regiones V_H o V_L se suelen fusionar recombinantemente bien con el gen III o el gen VIII del fago. Se pueden seleccionar fagos que expresen un dominio de unión al antígeno que se una a un antígeno de interés (es decir, un polipéptido Sp35 o un fragmento del mismo) o identificarse con el antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido a o capturado en una superficie sólida o perla.

Otros ejemplos de procedimientos de despliegue en fagos que se pueden usar para crear los anticuerpos incluyen los descritos en Brinkman *et al., J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames *et al., J. Immunol. Methods* 184:177186 (1995); Kettleborough *et al., Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic *et al., Gene* 187:9-18 (1997); Burton *et al., "Advances in Immunology"*, 57:191-280 (1994); Solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401; y las patentes estadounidenses n.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, tras seleccionar el fago, se puede aislar el anticuerpo de codificación de las regiones del fago y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresarlo en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al., BioTechniques* 12 (6) :864-869 (1992); y Sawai *et al., AJRI* 34: 26-34 (1995) y Better *et al., Science* 240:1041-1043 (1988)

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen los descritos en las patentes estadounidenses n.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al., Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu *et al., PNAS* 90: 7995-7.999 (1993) y Skerra *et al., Science* 240:1038-1040 (1988). Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo proceden de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison,

Science 229: 1202 (1985); Oi *et al., BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al., J. Immunol. Methods* 125: 191-202 (1989); patentes estadounidenses n.º 5.807.715; 4.816.567 y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos marco de las regiones marco humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican mediante procedimientos ampliamente conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de las secuencias para identificar los residuos de marco inusuales en determinadas posiciones. (Véase, por ejemplo, Queen *et al., Patente estadounidense n.º 5.585.089*; Riechmann *et al., Nature* 332: 323 (1988). Los anticuerpos se pueden humanizar mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses n.º 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o resurgimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5) :489-498 (1991); Studnicka *et al., "Protein Engineering"* 7 (6) :805-814 (1994); Roguska *et al., PNAS* 91: 969-973 (1994)) y barajado de cadenas

(patente estadounidense n.º 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden crear mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo los procedimientos de despliegue en fagos descritos anteriormente usando bancos de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, patentes estadounidenses n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos se pueden introducir aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de la cadena pesada y ligera humanos. Se pueden convertir los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera de ratón en no funcionales por separado o simultáneamente a la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Después, se crían los ratones quiméricos para producir descendencia homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido diana deseado. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados mediante tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. Así pues, mediante dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para una descripción detallada de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, y de los protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735; y las patentes estadounidenses n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318 y 5.939.598. Además, se pueden contratar empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y GenPharm (San Jose, CA) para el suministro de anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar mediante una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 12: 899-903 (1988)). Véase también, patente estadounidense n.º 5.565.332.

En otro ejemplo, se puede aislar fácilmente ADN que codifique los anticuerpos monoclonales deseados y secuenciarlo mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifiquen las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células híbridas aisladas y subclonadas sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, se puede colocar el ADN en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped procariontas o eucariotas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo, no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético, como se describe en la presente memoria) se puede usar para clonar las secuencias de la región constante y variable de la creación de anticuerpos según lo descrito en Newman *et al.*, patente estadounidense n.º 5.658.570, presentada el enero 25, 1995. Esencialmente, esto supone la extracción de ARN de las células seleccionadas, la conversión en ADNc y la amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este fin también se describen en patente estadounidense n.º 5.658.570. Como se tratará más detalladamente a continuación, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado se pueden cultivar en cantidades relativamente elevadas para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

En un ejemplo específico, se puede examinar la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mediante procedimientos que son ampliamente conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la comparación de secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de las secuencias. Con las técnicas de ADN recombinante rutinarias, se pueden insertar una o más de las CDR en regiones marco, por ejemplo, en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano. Las regiones marco pueden ser de origen natural o regiones marco de consenso y, preferentemente, regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Choithia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998) para obtener una lista de regiones marco humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado mediante la combinación de las regiones marco y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de un polipéptido deseado, por ejemplo, Sp35. Preferentemente, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del

anticuerpo a su antígeno. Además, se pueden usar dichos procedimientos para hacer sustituciones o eliminaciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro entre cadenas para generar moléculas de anticuerpo que carezcan de uno o más enlaces disulfuro entre cadenas. En la presente revelación y en la técnica, se engloban otras modificaciones del polinucleótido.

- 5 Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985)) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo murina de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se
10 obtienen de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

- Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente estadounidense n.º 4.694.778; Bird, *Science* 242: 423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 85: 5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, *Nature* 334:544-554 (1989)) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácido, dando lugar a un anticuerpo de una sola cadena. También se pueden usar las técnicas para el ensamblado de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242:1038-1041 (1988)).
15

- Los anticuerpos antagonistas de Sp35 también pueden ser humanos o anticuerpos sustancialmente humanos generados en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que no puedan producir de inmunoglobulina endógena (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.075.181; 5.939.598; 5.591.669 y 5.589.369. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de una matriz de genes de inmunoglobulina humana a dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Otro procedimiento preferido para
20 generar anticuerpos humanos usando ratones SCID se describe en la patente estadounidense n.º 5.811.524. Se apreciará que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos también se puede aislar y manipular según lo descrito en la presente memoria.

- En Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992), se revelan otros procedimientos muy eficaces para generar anticuerpos recombinantes. Específicamente, esta técnica genera anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además, esta técnica también se describe en las patentes estadounidenses cedidas comúnmente n.º 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096.
30

- En otro ejemplo, se pueden seleccionar linfocitos mediante micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado y cultivarlas durante 7 días *in vitro*. Se pueden rastrear los cultivos en busca de IgG específicas que cumplan los criterios de
35 selección. Se pueden aislar las células de los pocillos positivos. Se pueden aislar linfocitos B productores de Ig individuales mediante FACS o mediante su identificación en un análisis de placa hemolítica mediado por el complemento. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden micromanipular en un tubo, y se pueden amplificar los genes de V_H y V_L usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de V_H y V_L se pueden clonar en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarlos a células (por ejemplo, células eucarióticas o procarióticas) para su expresión.
40

- Alternativamente, se pueden seleccionar líneas celulares productoras de anticuerpos y cultivarlas mediante técnicas ampliamente conocidas por el experto en la técnica. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones principales. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la revelación según lo descrito a continuación se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).
45

Los anticuerpos para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o, preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante según lo descrito en la presente memoria.

- 50 Además, se apreciará que el alcance de la presente revelación abarca todos los alelos, variantes y mutaciones de las secuencias ADN de unión al antígeno.

- Como ya se sabe, el ARN se puede aislar de las células híbridas originales o de otras células transformadas mediante técnicas estándar, tales como la extracción en isotiocianato de guanidinio y la precipitación, seguida de la centrifugación o la cromatografía. Cuando se desee, se puede aislar ARNm del ARN total mediante técnicas convencionales tales como la cromatografía sobre celulosa de oligo dT. Las técnicas adecuadas son familiares en la materia.
55

En un ejemplo, se pueden crear los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, bien simultáneamente o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según procedimientos

ampliamente conocidos. La PCR puede ser iniciada por los cebadores consenso de la región constante o por cebadores más específicos basados en el ADN de la cadena pesada y ligera y las secuencias de aminoácidos publicados. Como se trató anteriormente, la PCR también se puede utilizar para aislar clones de ADN que codifiquen las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos. En este caso, los bancos pueden ser rastreados por los cebadores consenso o sondas homólogas de mayor tamaños tales como sondas de la región constante de ratón.

El ADN, comúnmente, ADN de plásmido, se puede aislar de las células por medio de técnicas conocidas en la materia, mapeado de restricción y secuenciado según técnicas estándar ampliamente conocidas expuestas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relativas a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente revelación en cualquier punto del proceso de aislamiento o en un análisis posterior.

La expresión recombinante de un anticuerpo o un fragmento, un derivado o un análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que sea un antagonista de Sp35, requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción de la misma (preferentemente, que contenga el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la revelación, se puede producir el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas ampliamente conocidas en la materia. Así pues los procedimientos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo se describen en la presente memoria. Se pueden usar procedimientos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de anticuerpos y las señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La revelación, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la revelación o una de sus cadenas pesada o ligera, o un dominio variable de cadena pesada o ligera unida operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; publicación PCT WO 89/01036; y la patente estadounidense n.º 5.122.464), pudiéndose clonar el dominio variable del anticuerpo en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y luego se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en la presente memoria. Por lo tanto, la revelación incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la revelación, o una cadena pesada o ligera del mismo, unido operativamente a un promotor heterólogo. En ejemplos preferidos para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras se pueden coexpresar en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla a continuación.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en un huésped para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en la presente memoria. Dichos sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificantes de interés y, posteriormente, purificarlas, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la revelación *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión virales recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BLK, 293, células 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferentemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente, para la expresión de la molécula completa de anticuerpo recombinante, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en combinación con un vector tal como el elemento promotor génico temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

En sistemas bacterianos, se puede seleccionar ventajosamente una serie de vectores de expresión en función del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se esté expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, se pueden desear vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se

- purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), en el que se puede ligar la secuencia de codificación del anticuerpo individualmente en el vector en marco con la región codificante de lacZ, de modo que se produzca una proteína; vectores pIN (Inouye y Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatona-agarosa, seguida de una elución en presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir trombina o sitios de escisión de la proteasa del factor Xa, de manera que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto GST.
- 10 En un sistema de insecto, comúnmente, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Se puede clonar individualmente la secuencia de codificación del anticuerpo en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarla bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).
- 15 En las células huésped de mamífero, se puede utilizar una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la traducción/transcripción de adenovirus, por ejemplo, al promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que será viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados. (Véase, por ejemplo, Logan y Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:355-359 (1984)). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias de codificación de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción y los codones de iniciación exógenos pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (Véase Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).
- 20 Además, se puede seleccionar una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y dicho procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traduccional, y la modificación de proteínas y de productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares apropiadas o sistemas huésped para garantizar la correcta modificación y el correcto procesamiento de la proteína foránea expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucarióticas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 y, en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y línea celular de glándula mamaria normal tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.
- 30 Para la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, es posible diseñar genéticamente líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, se pueden transformar las células huésped con ADN controlado por elementos apropiados para el control de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, se puede permitir el crecimiento de las células diseñadas genéticamente durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección, y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan formando focos que, a su vez, se puedan clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento se puede usar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo.
- 40 Se puede usar una serie de sistemas de selección, entre los que se incluyen, pero sin limitación, genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 48: 202 (1992)) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22: 817, 1980) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, se puede usar la resistencia antimetabólica como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (*Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); *TIB TECH* 11(5):155-215 (mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Los procedimientos de tecnología de ADN recombinante comúnmente conocidos en la técnica que se pueden usar se describen en Ausubel *et al.*, (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler,
- 50
- 55
- 60

“Gene Transfer and Expression”, Manual de laboratorio, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al., (Eds), “Current Prolocols in Human Genetics”, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981).

5 Se pueden aumentar los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, “The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning”, Academic Press, Nueva York, vol. 3. (1987)). Cuando un marcador del sistema vectorial que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

10 La célula huésped se puede cotransfectar con dos vectores de expresión de la revelación, el primer vector codificante de un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codificante de un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un único vector que codifique los polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se coloca ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.* 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

15 Una vez expresada recombinantemente una molécula de anticuerpo de la revelación, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente, de afinidad por el antígeno específico tras la proteína A, y de columna), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Alternativamente, en el documento US 2002 0123057 A1, se describe un procedimiento preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la revelación.

20 En un ejemplo, una molécula de unión o molécula de unión al antígeno para su uso en los procedimientos de la revelación comprende una región constante sintética en la se han eliminado parcial o totalmente uno o más dominios (“anticuerpos con dominios eliminados”). En ciertos ejemplos, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos con dominios eliminados o variantes en las que se haya retirado todo el dominio C_{H2} (constructos ΔC_{H2}). En otros casos, se puede sustituir un péptido conector corto por el dominio eliminado para aportar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos constructos son particularmente preferidos debido a las propiedades reguladoras del dominio C_{H2} sobre la tasa catabólica del anticuerpo.

25 En ciertos ejemplos, los anticuerpos modificados para su uso en los procedimientos revelados en la presente memoria son minicuerpos. Los minicuerpos se pueden crear mediante procedimientos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.837.821 o WO 94/09817A1).

30 En otro ejemplo, los anticuerpos modificados para su uso en los procedimientos revelados en la presente memoria son anticuerpos con el dominio C_{H2} eliminado conocidos en la técnica. Los constructos con dominios eliminados se pueden obtener mediante un vector (por ejemplo, de Biogen IDEC Incorporated) que codifique un dominio constante humano de IgG₁ (véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/060955A2 y W002/096948A2). Este ejemplo de vector se diseñó genéticamente para eliminar el dominio C_{H2} y proporcionar un vector sintético que expresara una región constante de IgG₁ con el dominio eliminado.

35 En un ejemplo, un anticuerpo antagonista de Sp35 o un fragmento del mismo para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la eliminación o sustitución de unos cuantos o incluso un único aminoácido, siempre y cuando permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, puede bastar con la mutación de un solo aminoácido en zonas seleccionadas del dominio C_{H2} para reducir sustancialmente la unión a Fc, aumentando así la localización del tumor. De manera similar, se puede desear la eliminación, simplemente, de la parte de uno o más dominios de región constante que controla la función efectora (por ejemplo, la unión al complemento) que se vaya a modular. Dichas eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero), dejando intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante en cuestión. Además, como se ha aludido anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos se pueden sintetizar mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, mejorando el perfil del constructo resultante. A este respecto, se puede interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc), manteniendo sustancialmente a la vez la configuración y el perfil inmunógeno del anticuerpo modificado. Otros ejemplos más comprenden la adición de uno o más aminoácidos de la región constante para mejorar características deseables tales como la función efectora, o proporcionar más citotoxina o fijación de hidratos de carbono. En dichos ejemplos, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de determinados dominios de región constante.

La presente revelación también proporciona el uso de anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o

consisten en variantes (incluyendo derivados) de las moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones V_H y/o regiones V_L) descritas en la presente memoria, anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido Sp35. Se pueden usar técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de unión, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con relación a la región V_H de referencia, V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, región V_L , V_L CDR1, V_L CDR2 o V_L CDR3. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica, se han descrito las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, se pueden introducir mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis de saturación, y se pueden rastrear los mutantes resultantes en busca de actividad biológica para identificar los mutantes que conserven la actividad.

Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones únicamente en las regiones marco o únicamente en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o neutras de sentido erróneo, es decir, que tengan un efecto escaso o nulo en la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Alternativamente, las mutaciones de sentido erróneo no neutras pueden modificar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo neutras y silenciosas esté en las regiones marco, mientras que lo probable es que la ubicación de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo no neutras esté en la CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. El experto en la técnica podría diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como la no alteración de la actividad de unión al antígeno o la alteración de la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, se puede expresar la proteína codificada de una manera rutinaria, pudiéndose determinar la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada mediante técnicas descritas en la presente memoria o modificando las técnicas habituales conocidas en la materia.

Proteínas de fusión, y polipéptidos y anticuerpos conjugados

Los polipéptidos Sp35 y los anticuerpos para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria se pueden además fusionar recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el extremo N-terminal o C-terminal, o conjugar químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los polipéptidos o anticuerpos antagonistas de Sp35 se pueden fusionar recombinantemente a o conjugar con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente estadounidense n.º 5.314.995 y el documento EP 396.387.

Los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula de modo que la unión covalente no impida que el polipéptido o el anticuerpo antagonista de Sp35 inhiba la función biológica de Sp35. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 de la presente revelación se pueden modificar, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 se pueden modificar mediante procesos naturales tales como el procesamiento postraducciono o mediante técnicas de modificación química que son ampliamente conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están extensamente descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en el amplio conjunto de trabajos de investigación. Las

- modificaciones se pueden producir en cualquier parte polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35, incluyendo la estructura central peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como hidratos de carbono. Se apreciará que un mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un determinado polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35.
- 5 Además, un polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de una ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos y anticuerpos antagonistas de Sp35 cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales posteriores a la traducción o se pueden preparar mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación,
- 10 ribosilación de ADP, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de un resto hemo, enlace covalente de un nucleótido o un derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o un derivado de lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces de tipo disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gammacarboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristolilación, oxidación, pegilación,
- 15 procesamiento proteolítico, fosforilación, fenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, "Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman y colaboradores, Nueva York, II ed. (1993); "Posttranslational Covalent Modification of Proteins", B. C. Johnson, Ed, Academic Press, Nueva York, pp. 1-12 (1983); Seifler *et al.*, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).
- 20 La presente revelación también proporciona proteínas de fusión que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en una fusión de polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 que inhibe la función de Sp35. Preferentemente, el polipéptido heterólogo al que se fusiona el polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 es útil para la función o es útil para dirigir el polipéptido o el anticuerpo antagonista de Sp35. En ciertos ejemplos de la revelación, el polipéptido antagonista de Sp35 soluble, por ejemplo, un polipéptido Sp35 que comprende los dominios LRR, el dominio Ig o el dominio extracelular completo (correspondiente a los aminoácidos 34 a 532 de la SEC ID N.º 2) se fusiona a un resto de polipéptido heterólogo para formar un polipéptido de fusión antagonista de Sp35. Las proteínas de fusión y los anticuerpos antagonistas de Sp35 se pueden usar para lograr diversos objetivos,
- 25 por ejemplo, aumentar la semivida en suero, aumentar la biodisponibilidad, el direccionamiento *in vivo* hacia un órgano o tipo de tejido específico, mejorar la eficiencia de la expresión recombinante, mejorar la secreción de la célula huésped, facilitar la purificación y aumentar la avidéz. Dependiendo del/de los objetivo/s que se desee/n alcanzar, el resto heterólogo puede ser inerte o biológicamente activo. Además, se puede optar por que esté fusionado establemente al polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35, o por que sea escindible *in vitro* o *in vivo*. Los restos heterólogos para alcanzar estos otros objetivos son conocidos en la técnica.
- 30 Como alternativa a la expresión de un anticuerpo o polipéptido de fusión antagonista de Sp35, se puede preformar un resto heterólogo seleccionado y conjugarlo químicamente con el polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35. En la mayoría de los casos, un resto heterólogo seleccionado funcionará de manera similar, ya esté fusionado o conjugado con el polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35. Por lo tanto, en la siguiente descripción de secuencias heterólogas de aminoácidos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que la secuencia heteróloga puede estar unida al polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 en forma de una proteína de fusión o
- 35 de un conjugado químico.
- 40 Los polipéptidos farmacológicamente activos, tales como los polipéptidos o anticuerpos antagonistas de Sp35, a menudo presentan una rápida eliminación *in vivo*, por lo que se requieren grandes dosis para alcanzar concentraciones terapéuticamente eficaces en el cuerpo. Además, los polipéptidos de tamaño menor de aproximadamente 60 kDa pueden experimentar filtración glomerular, lo que a veces conduce a nefrotoxicidad. Se puede emplear la fusión o la conjugación de polipéptidos relativamente pequeños, tales como los polipéptidos o anticuerpos antagonistas de Sp35, para reducir o evitar el riesgo de dicha nefrotoxicidad. Se conocen varias secuencias heterólogas de aminoácidos, es decir, restos o "vehículos" polipeptídicos, para aumentar la estabilidad *in vivo*, es decir, la semivida en suero, de polipéptidos terapéuticos.
- 45 Debido a su larga semivida, a su amplia distribución *in vivo* y a la ausencia de función enzimática o inmunológica, la albúmina de suero humano (HSA) de longitud esencialmente completa, o un fragmento de HSA, se usan comúnmente como resto heterólogo. Mediante la aplicación de procedimientos y materiales tales como los mostrados en Yeh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:1904-1908 (1992) y Syed *et al.*, *Blood* 89: 3243-52 (1997), se puede usar HSA para formar un anticuerpo o polipéptido de fusión antagonista de Sp35 o un conjugado de polipéptido/anticuerpo que muestre actividad farmacológica en virtud del resto Sp35, mostrando a la vez una
- 50 estabilidad *in vivo* significativamente mayor, por ejemplo, 10 veces a 100 veces superior. El extremo C-terminal de la HSA se puede fusionar al extremo N-terminal del resto Sp35 soluble. Puesto que la HSA es una proteína secretada de forma natural, cuando la proteína de fusión se produce en un eucariota, por ejemplo, en un sistema de expresión de mamífero, se puede aprovechar la secuencia señal de HSA para obtener la secreción de la proteína de fusión Sp35 soluble en el medio de cultivo celular.
- 55 La secuencia señal es un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplasmático. Las secuencias señal útiles para la construcción de una inmunofusina incluyen secuencias señal de cadena ligera de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo 14.18 (Gillies
- 60

et al., *J. Immunol. Meth.* 125:191-202 (1989)), secuencias señal de cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, la secuencia señal de la cadena pesada del anticuerpo MOPC141 (Sakano *et al.*, *Nature* 286: 5774 (1980)). Alternativamente, se pueden usar otras secuencias señal. Véase, por ejemplo, Watson, *Nucl. Acids Res.* 12:5145 (1984). El péptido señal habitualmente es escindido en el lumen del retículo endoplasmático por peptidasas señal.

5 Esto produce la secreción de una proteína de inmunofusina que contiene la región Fc y el resto Sp35 soluble.

En algunos ejemplos, la secuencia de ADN puede codificar un sitio de escisión proteolítica entre el casete de secreción y el resto Sp35 soluble. Dicho sitio de escisión puede proporcionar, por ejemplo, la escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada, separando así el dominio Fc de la proteína diana. Los sitios de escisión proteolítica útiles incluyen secuencias de aminoácidos reconocidas por enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmina,

10 trombina, factor Xa o enteroquinasa K.

El casete de secreción se puede incorporar en un vector de expresión replicable. Los vectores útiles incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos y similares. Un vector de expresión ejemplar es el pdC, en el que la transcripción del ADN de inmunofusina se coloca bajo el control del potenciador y del promotor del citomegalovirus humano. Véase, por ejemplo, Lo *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1088:712 (1991); y Lo *et al.*, "Protein Engineering", 11:495-500 (1998). Se puede transformar y transfectar una célula huésped apropiada con un ADN que codifique un polipéptido Sp35 soluble, y usarla para la expresión y la secreción del polipéptido Sp35 soluble. Las células huésped que se usan normalmente incluyen células híbridas inmortales, células de mieloma, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y células COS.

20 En un ejemplo, se fusiona un polipéptido Sp35 soluble a una bisagra y una región Fc, es decir, la porción C-terminal de una región constante de cadena pesada de Ig. Las posibles ventajas de una fusión de sp35-Fc incluyen la solubilidad, la estabilidad *in vivo* y la multivalencia, por ejemplo, la dimerización. La región Fc usada puede ser una región Fc de IgA, IgD o IgG (bisagra-C_H2-C_H3). Alternativamente, puede ser una región Fc de IgE o IgM (bisagra-C_H2-C_H3-C_H4). En general, se usa una región Fc de IgG, por ejemplo, una región Fc de IgG₁ o una región Fc de IgG₄. En un ejemplo, en la fusión, se usa una secuencia que comienza en la región bisagra justo secuencia arriba del sitio de escisión de la papaína que define Fc de IgG químicamente (es decir, el residuo 216, tomando el primer residuo de la región constante de cadena pesada como el 114 según el sistema de Kabat) o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. El sitio exacto en el que se realiza la fusión no es determinante; se conocen ampliamente determinados sitios y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la molécula. En la técnica se conocen los materiales y los procedimientos para construir

30 y expresar ADN codificante de fusiones de Fc, y se pueden aplicar para obtener fusiones de Sp35 solubles sin la necesidad de realizar experimentación. Algunos ejemplos de la revelación emplean una proteína de fusión Sp35 tal como las descritas en Capon *et al.*, patentes estadounidense n.º 5.428.130 y 5.565.335.

Las regiones Fc de tipo natural completamente intactas presentan funciones efectoras que normalmente son innecesarias y no deseadas en una proteína de fusión Fc usada en los procedimientos de la presente revelación. Por lo tanto, comúnmente, se eliminan ciertos sitios de unión de la región Fc durante la construcción del casete de secreción. Por ejemplo, puesto que la coexpresión con la cadena ligera es innecesaria, se elimina el sitio de unión para la proteína de unión de cadena pesada, Bip (Hendershot *et al.*, *Immunol. Today* 8:111-14 (1987)), del dominio C_H2 de la región Fc de la IgE, de modo que este sitio no interfiera en la secreción eficaz de la inmunofusina. En general, también se eliminan las secuencias de dominios transmembrana tales como las presentes en IgM.

40 La que más se suele usar es la región Fc de IgG₁. Alternativamente, en el casete de secreción, se puede usar la región Fc de las otras subclases de inmunoglobulina gamma (gamma-2, gamma 3 y gamma-4). En general, en el casete de secreción, se usa la región Fc de IgG₁ de la inmunoglobulina gamma-1, e incluye al menos parte de la región bisagra, la región C_H2 y la región C_H3. En algunos ejemplos, la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1 es una Fc con C_H2 eliminada, que incluye parte de la región bisagra y la región C_H3, pero no la región C_H2. Gillies *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 1:47 (1990) han descrito una Fc con C_H2 eliminada. En algunos ejemplos, se usa la región Fc de una entre IgA, IgD, IgE o IgM.

50 Las proteínas de fusión Sp35-Fc se pueden construir en varias configuraciones diferentes. En una configuración, se fusiona el extremo C-terminal del resto Sp35 directamente al extremo N-terminal del resto Fc. En una configuración ligeramente diferente, se incorpora un polipéptido corto, por ejemplo, de 2-10 aminoácidos, a la fusión entre el extremo N-terminal del resto Sp35 y el extremo C-terminal del resto Fc. Dicho ligador proporciona flexibilidad configuracional que, en algunos casos, puede mejorar la actividad biológica. Si se conserva una parte suficiente de la región bisagra en el resto Fc, la fusión Sp35-Fc se dimerizará, formando de este modo una molécula bivalente. Una población homogénea de fusiones Fc monoméricas producirá dímeros bivalentes mono-específicos. Una mezcla de dos fusiones Fc monoméricas, cada una con una especificidad diferente, producirá dímeros bivalentes, biespecíficos.

60 Se puede usar cualquiera de una serie de reticuladores que contengan un grupo reactivo amino correspondiente y el grupo reactivo tiol para unir Sp35 a albúmina sérica. Los ejemplos de ligadores adecuados incluyen reticuladores reactivos con amina que insertan una maleimida reactiva con tiol, por ejemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS y GMBS. Otros ligadores adecuados insertan un grupo haloacetato reactivo con tiol, por ejemplo, SBAP, SIA, SIAB. Los ligadores que proporcionan un tiol protegido o no protegido para la reacción con

grupos sulfhidrilo para producir un enlace reducible incluyen SPDP, SMPT, SATA y SATP. Dichos reactivos están disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemicals).

La conjugación no tiene que implicar el extremo N-terminal de un polipéptido Sp35 soluble ni el resto tiol en la albúmina sérica. Por ejemplo, se pueden obtener fusiones Sp35 soluble-albúmina mediante técnicas de ingeniería genética, en las que el resto Sp35 soluble se fusione al gen de la albúmina sérica en su extremo N-terminal, C-terminal o en ambos.

Los polipéptidos Sp35 solubles se pueden fusionar a péptidos heterólogos para facilitar la purificación o la identificación del resto Sp35 soluble. Por ejemplo, se puede fusionar un marcador de histidina a un polipéptido Sp35 soluble para facilitar la purificación usando un medio de cromatografía disponible en el mercado.

10 En algunos casos de la revelación, se usa un constructo de fusión Sp35 soluble para potenciar la producción de un resto Sp35 soluble en bacterias. En dichos constructos, se emplea una proteína bacteriana normalmente expresada y/o secretada a un nivel elevado como pareja de fusión N-terminal de un polipéptido Sp35 soluble. Véase, por ejemplo, Smith *et al.*, *Gene* 67:31 (1988); Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204 (1998); La Vallie *et al.*, *Biotechnology* 11:187 (1993).

15 Fusionando un resto Sp35 soluble a los extremos amino y carboxilo de una pareja de fusión adecuada, se pueden obtener formas bivalentes o tetravalentes de un polipéptido Sp35 soluble. Por ejemplo, se puede fusionar un resto Sp35 soluble a los extremos amino y carboxilo de un resto Ig para producir un polipéptido monomérico bivalente que contenga dos restos Sp35 solubles. Tras la dimerización de dos de estos monómeros, en virtud del resto Ig, se obtiene una forma tetravalente de una proteína Sp35 soluble. Dichas formas multivalentes se pueden usar para conseguir una mayor afinidad de unión por la diana. También se pueden obtener formas multivalentes de Sp35 soluble colocando restos Sp35 solubles en tándem para formar concatámeros, que se pueden emplear solos o fusionados a una pareja de fusión tal como Ig o HSA.

Polímeros Conjugados (diferentes de los polipéptidos)

25 Algunos casos de la revelación implican un polipéptido Sp35 soluble o un anticuerpo Sp35 en el que se conjugan uno o más polímeros (unidos covalentemente) con el polipéptido o el anticuerpo Sp35. Los ejemplos de polímeros adecuados para dicha conjugación incluyen polipéptidos (tratados anteriormente), polímeros de azúcar y cadenas de polialquilenglicol. Comúnmente, pero no necesariamente, un polímero se conjuga con el polipéptido Sp35 soluble o el anticuerpo Sp35 con el propósito de mejorar una o más de las siguientes características: solubilidad, estabilidad, o biodisponibilidad.

30 Una clase de polímero generalmente usado para la conjugación con un anticuerpo o un polipéptido antagonista de Sp35 es un polialquilenglicol. El polietilenglicol (PEG) es el que se usa con mayor frecuencia. Los restos de PEG, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 polímeros de PEG, pueden conjugarse con cada polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 para aumentar la semivida en suero, en comparación con el polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 solo. Los restos de PEG son no antigénicos y esencialmente inertes biológicamente. Los restos de PEG usados en la práctica de la revelación pueden estar ramificados o no ramificados.

35 La cantidad de restos de PEG unidos al polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 y el peso molecular de las cadenas de PEG individuales pueden variar. En general, cuanto mayor es el peso molecular del polímero, menor es la cantidad de cadenas de polímero unidas al polipéptido. Habitualmente, la masa total de polímero unido al polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 es de 20 kDa a 40 kDa. Por lo tanto, si se une una cadena de polímero, el peso molecular de la cadena es generalmente de 20-40 kDa. Si se unen dos cadenas, el peso molecular de cada cadena es generalmente de 10-20 kDa. Si se unen tres cadenas, el peso molecular es en general de 7-14 kDa.

45 El polímero, por ejemplo, PEG, se puede unir al polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 a través de cualquier grupo reactivo expuesto adecuado en el polipéptido. El grupo o grupos reactivos expuestos pueden ser, por ejemplo, un grupo amino N-terminal o el grupo épsilon amino de un residuo de lisina interno, o ambos. Un polímero activado puede reaccionar y unirse covalentemente en cualquier grupo amino libre en el polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35. También se pueden usar grupos carboxílicos libres, grupos carbonilo adecuadamente activados, restos hidroxilo, guanidilo, imidazol, carbohidrato oxidado y grupos mercapto del polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35 (si están disponibles) como grupos reactivos para la unión del polímero.

50 Comúnmente, en una reacción de conjugación, se emplean de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 moles de polímero activado por mol de polipéptido, en función de la concentración de polipéptido. Habitualmente, la proporción elegida representa un equilibrio entre la maximización de la reacción minimizando al mismo tiempo las reacciones secundarias (a menudo, inespecíficas) que pueden alterar la actividad farmacológica deseada del polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35. Preferentemente, se conserva al menos el 50% de la actividad biológica (como se demuestra, por ejemplo, en cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica) del polipéptido o anticuerpo antagonista de Sp35, y mucho más preferentemente se conserva casi el 100%.

El polímero puede conjugarse con el anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35 mediante la química convencional. Por ejemplo, se puede acoplar un resto de polialquilenglicol a un grupo amino épsilon de lisina del anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35. La unión a la cadena lateral de lisina se puede realizar con un éster activo de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) tal como succinimidil-succinato de PEG (SS-PEG) y succinimidil-propionato de PEG (SPA-PEG). Los restos de polialquilenglicol adecuados incluyen, por ejemplo, carboximetil-NHS y norleucina-NHS, SC. Estos reactivos se encuentran disponibles en el mercado. Otros ligadores adicionales de PEG reactivos a amina pueden sustituir al resto succinimidilo. Éstos incluyen, por ejemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos (PNP), epóxidos, benzotriazol-carbonatos, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carbonilimidazol y carbonato de PNP. Habitualmente, las condiciones se optimizan para maximizar la selectividad y el grado de reacción. Dicha optimización de las condiciones de reacción pertenece a la técnica habitual.

La PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, "Focus on Growth Factors", 3: 4-10, (1992); y las solicitudes de patente europea EP 0 154 316 y EP 0 401 384. La PEGilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo).

La PEGilación mediante acilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado de éster activo de polietilenglicol. Se puede emplear cualquier molécula de PEG reactiva en la PEGilación. Frecuentemente, como éster de PEG activado, se usa PEG esterificado con *N*-hidroxisuccinimida (NHS). Como se usa en la presente memoria, "acilación" incluye, sin limitación, los siguientes tipos de enlaces entre la proteína terapéutica y un polímero hidrosoluble tal como PEG: amida, carbamato, uretano y similares. Véase, *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140, 1994. En general, los parámetros de reacción se seleccionan para evitar condiciones de temperatura, disolvente y pH que dañen o desactiven el polipéptido Sp35 soluble.

Generalmente, el enlace conector es una amida y, por lo común, al menos el 95% del producto resultante está jmono-, di- o tri-PEGilado. Sin embargo, se pueden formar algunas especies con grados superiores de PEGilación en cantidades que dependen de las condiciones de reacción específicas usadas. Opcionalmente, las especies PEGiladas purificadas se separan de la mezcla, particularmente, especies sin reaccionar, mediante procedimientos de purificación convencionales, incluyendo, por ejemplo, diálisis, desalado, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel, y electroforesis.

La PEGilación mediante alquilación generalmente implica hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal de PEG con anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35 en presencia de un agente reductor. Además, se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la PEGilación sustancialmente sólo en el grupo amino N-terminal del anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35, es decir, una proteína mono-PEGilada. Bien en caso de mono-PEGilación o de poli-PEGilación, los grupos de PEG se unen comúnmente a la proteína mediante un grupo $-C_H2-NH-$. Con referencia particular al grupo $-C_H2-$, este tipo de enlace se conoce como enlace "alquilo".

La derivación mediante alquilación reductora para producir un producto mono-PEGilado dirigido N-terminalmente aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (de lisina frente al extremo N-terminal) disponibles para la derivación. La reacción se realiza a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos amino épsilon de los residuos de lisina y el grupo amino N-terminal de la proteína. Mediante dicha derivación selectiva, se controla la unión de un polímero hidrosoluble que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, con una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo N-terminal de la proteína y no se produce una modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina.

Las moléculas de polímero usadas en los enfoques tanto de acilación como de alquilación se seleccionan entre polímeros hidrosolubles. Por lo común, el polímero seleccionado se modifica para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de modo que sea posible controlar el grado de polimerización según los presentes procedimientos. Un aldehído de PEG reactivo ejemplar es propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados mono-ariloxilo o mono-alcoxilo C1-C10 del mismo (véase, por ejemplo, Harris *et al.*, patente de estadounidense n.º 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el polímero o los polímeros seleccionados comúnmente tienen un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora, el polímero o los polímeros seleccionados comúnmente tienen un único grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero hidrosoluble no se seleccionará entre residuos de glucosilo de origen natural, ya que éstos se fabrican más convenientemente mediante sistemas de expresión recombinante de mamífero.

Los procedimientos para preparar un anticuerpo o polipéptido Sp35 soluble PEGilado generalmente incluyen las etapas de (a) hacer reaccionar un anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35 con polietilenglicol (tal como un derivado de éster o de aldehído reactivo de PEG) en condiciones mediante las que la molécula llega a unirse a uno o más grupos de PEG, y (b) obtener el producto o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán caso por caso en base a parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la proporción entre el PEG y la proteína, generalmente, mayor será el porcentaje de producto poli-PEGilado.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de mono-polímero/polipéptido Sp35 soluble o anticuerpo Sp35 generalmente incluye las etapas de: (a) hacer reaccionar una proteína o un polipéptido Sp35 soluble con una molécula de PEG reactiva en condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo amino N-terminal del polipéptido o anticuerpo; y (b) obtener el producto o los productos de reacción.

Para una población sustancialmente homogénea de mono-polímero/polipéptido Sp35 soluble o anticuerpo Sp35, las condiciones de reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva del resto de polímero hidrosoluble al extremo N-terminal del polipéptido o anticuerpo. Dichas condiciones de reacción generalmente proporcionan diferencias de pKa entre los grupos amino de la cadena lateral de lisina y el grupo amino N-terminal. Para los propósitos de la presente revelación, en general, el pH está en el intervalo de 3-9, comúnmente, 3-6.

Los anticuerpos o polipéptidos Sp35 solubles pueden incluir un marcador, por ejemplo, un resto que pueda liberarse posteriormente mediante proteólisis. Así pues, el resto de lisina se puede modificar selectivamente haciendo reaccionar primero un marcador de His modificado con un ligador de bajo peso molecular tal como reactivo de Traut (Pierce) que reaccionará tanto con la lisina como con el extremo N-terminal y, después, liberando este marcador de His. El polipéptido entonces contendrá un grupo SH libre que puede modificarse selectivamente con un PEG que contenga un grupo principal reactivo al tiol tal como un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, o un SH libre o protegido.

El reactivo de Traut se puede reemplazar por cualquier ligador que establezca un sitio específico para la unión de PEG. Por ejemplo, el reactivo de Traut se puede reemplazar por SPDP, SMPT, SATA o SATP (Pierce). De igual manera, se podría hacer reaccionar la proteína con un ligador reactivo a amina que inserte una maleimida (por ejemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS o GMBS), un grupo haloacetato (SBAP, SIA, SIAB) o un grupo vinilsulfona, y hacer reaccionar el producto resultante con un PEG que contenga un SH libre.

En algunos casos, el resto de polialquilenglicol se acopla a un grupo de cisteína del anticuerpo o polipéptido antagonista de Sp35. El acoplamiento se puede efectuar usando, por ejemplo, un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato o un grupo tiol.

Opcionalmente, el anticuerpo o polipéptido Sp35 soluble se conjuga con el resto de polietilenglicol a través de un enlace lábil. El enlace lábil puede escindirarse en, por ejemplo, hidrólisis química, proteólisis o escisión de sulfhidrilo. Por ejemplo, el enlace puede escindirarse en condiciones *in vivo* (fisiológicas).

Las reacciones pueden tener lugar mediante cualquier procedimiento adecuado usado para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, generalmente, a un pH de aproximadamente 5-8, por ejemplo, pH 5, 6, 7 ó 8, si los grupos reactivos están en el grupo amino alfa en el extremo N-terminal. Generalmente el procedimiento implica preparar un polímero activado y, tras ello, hacer reaccionar la proteína con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para formulación.

Antagonistas del polinucleótido Sp35

Ejemplos específicos comprenden un procedimiento para tratar un trastorno de desmielinización o dismielinización que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista del polinucleótido Sp35 que comprende una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a un polinucleótido que codifica Sp35. El antagonista del polinucleótido Sp35 impide la expresión de Sp35 (desactivación). Los antagonistas del polinucleótido Sp35 incluyen, pero sin limitación, moléculas antisentido, ribozimas, ARNip, ARNhp y ARNi. Comúnmente, Dichas moléculas de unión se administran por separado al animal (véase, por ejemplo, O'Connor, *J. Neurochem.* 56: 560 (1991), pero dichas moléculas de unión también se pueden expresar *in vivo* desde polinucleótidos tomados por una célula huésped y expresados *in vivo*. Véase también "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988).

ARNi se refiere a la expresión de un ARN que interfiere con la expresión del ARNm diana. Específicamente, el ARNi silencia un gen diana a través de la interacción con el ARNm específico (por ejemplo, Sp35) a través de un ARNip (ARN de interferencia pequeño). El complejo de ARN bicatenario es entonces la diana de la degradación mediante la célula. Otras moléculas de ARNi incluyen el ARN en horquilla pequeño (ARNhp), también una horquilla corta de interferencia. La molécula de ARNhp contiene secuencias sentido y antisentido de un gen diana conectadas por un bucle. El ARNhp se transporta desde el núcleo hacia el citoplasma, se degrada junto con el ARNm. Se pueden usar promotores Pol III o U6 para expresar ARN para ARNi.

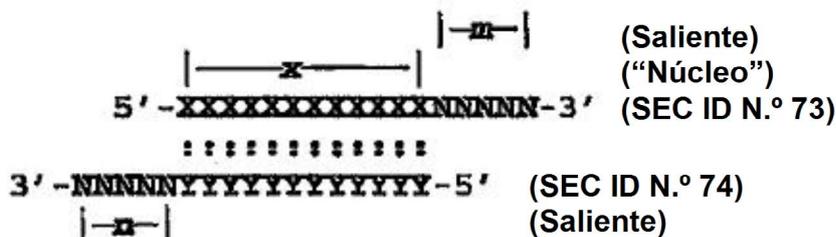
El ARNi está mediado por moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) que tienen una homología específica de la secuencia con sus ARNm "diana" (Caplen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 98:9742-9747, 2001). Los estudios bioquímicos en lisados libres de células de *Drosophila* indican que los mediadores del silenciamiento génico dependiente del ARN son dúplex de ARN "de interferencia pequeños" (ARNip) de 21-25 nucleótidos. Por consiguiente, las moléculas de ARNip se usan ventajosamente en los procedimientos de la presente revelación. Los ARNip se obtienen mediante el procesamiento de ARNbc por parte de una RNasa conocida como DICER (Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001). Parece ser que los productos de dúplex de ARNip son reclutados en un complejo de ARNip multiproteico denominado RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin el deseo de quedar

vinculados a ninguna teoría en particular, se cree que un RISC es guiado hacia un ARNm diana, en el que el dúplex de ARNi interactúa específicamente con la secuencia para mediar la escisión de una manera catalítica (Bernstein *et al.*, *Nature* 409: 363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr Biol* 11: 1776-1780, 2001).

5 Se ha usado ARNi para analizar la función de genes y para identificar genes esenciales en células de mamíferos (Elbashir *et al.*, *Methods* 26: 199-213, 2002; Harborth *et al.*, *J Cell Sci.* 114:4557-4565, 2001), incluyendo a modo de ejemplo no restrictivo las neuronas (Krichevski *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 99: 11926-11929, 2002). El ARNi también se está evaluando para modalidades terapéuticas, tales como la inhibición o el bloqueo de la infección, la replicación y/o el crecimiento de virus, incluyendo sin limitación poliovirus (Gitlin *et al.*, *Nature* 418: 379-380, 2002) y el VIH (Capodici *et al.*, *J. Immunol* 169: 5196-5201, 2002), y la reducción de la expresión de oncogenes (por ejemplo, el gen bcr-abl; Scherr *et al.*, *Blood* 26 de septiembre, publicación electrónica antes de la impresión, 2002). El ARNi se ha usado para modular la expresión génica en embriones de mamíferos (ratón) y de anfibios (*Xenopus*) (respectivamente, Calegari *et al.*, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 99: 14236-14240, 2002; y Zhou, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 30:1664-1669, 2002) y en ratones postnatales (Lewis *et al.*, *Nat Genet* 32: 107-108, 2002), y para reducir la expresión en ratones transgénicos adultos (McCaffrey *et al.*, *Nature*, 418:38-39, 2002). Se han descrito procedimientos para la determinación de la eficacia y la especificidad de ARNi en cultivo celular e *in vivo* (véase, por ejemplo, Bertrand *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 296:1000-1004, 2002; Lassus *et al.*, *Sci STKE* 2002 (147): PL13 2002; y Leirdal *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*295:744-748, 2002).

Las moléculas que median el ARNi, incluyendo, sin limitación, ARNi, se pueden producir *in vitro* mediante síntesis química (Hohjoh, *FEBS Lett* 521:195-199, 2002), hidrólisis de ARNbc (Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 99:9942-9947, 2002), mediante transcripción *in vitro* con ARN polimerasa de T7 (Donzeet *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 30: e46, 2002; Yu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 99: 6047-6052, 2002) e hidrólisis de ARN bicatenario usando una nucleasa tal como RNasa III de *E. coli* (Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 99:9942-9947, 2002).

También se pueden formar moléculas de ARNi mediante el apareamiento de dos oligonucleótidos entre sí, comúnmente, con la siguiente estructura general, que incluye partes tanto partes monocatenarias como bicatenarias:



25 En la que N, X e Y son nucleótidos; enlaces de hidrógeno X a Y; ":" significa un enlace de hidrógeno entre dos bases; x es un número entero natural que tiene un valor entre 1 y aproximadamente 100; y m y n son números enteros que tienen, de forma independiente, valores DE entre 0 y aproximadamente 100. En algunos casos, N, X e Y son independientemente A, G, C y T o U. Pueden estar presentes bases y nucleótidos no naturales, particularmente, en el caso de ARNi sintéticos (es decir, el producto del apareamiento de dos oligonucleótidos). La sección central bicatenaria se denomina "núcleo" y tiene pares de bases (pb) como unidades de medida; las partes monocatenarias son salientes que tienen nucleótidos (nt) como unidades de medida. Los salientes mostrados son salientes 3', pero la revelación también engloba moléculas con salientes 5'. En del alcance de la revelación, también hay moléculas de ARNi sin salientes (es decir, m = 0 y n = 0) y aquéllas que tienen un saliente en un lado del núcleo, pero no en el otro (por ejemplo, m = 0 y n ≥ 1, o viceversa).

Inicialmente, la tecnología de ARNi no parecía ser de fácil aplicación en los sistemas de mamíferos. Esto se debía a que, en los mamíferos, el ARNbc activa proteína quinasa (PKR) activada por ARNbc, produciendo en una cascada de apoptosis y muerte celular (Der *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 3279-3283, 1997). Además, hace tiempo que se sabe que el ARNbc activa la cascada de interferón en células de mamífero, lo que también puede conducir a la alteración de la fisiología celular (Colby *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 25:333, 1971; Kleinschmidt *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 41:517, 1972; Lampson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 58L782, 1967; Lomniczi *et al.*, *J. Gen. Virol.* 8:55, 1970; y Younger *et al.*, *J. Bacteriol.* 92:862, 1966). Sin embargo, la activación mediada por ARNbc de la PKR y las cascadas de interferón requiere ARNbc más largo que aproximadamente 30 pares de bases. Por el contrario, se ha demostrado que el ARNbc de menos de 30 pares de bases de longitud produce ARNi en células de mamífero (Caplen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 9742-9747, 2001). Por lo tanto, se espera poder evitar los efectos inespecíficos no deseados asociados con las moléculas de ARNbc más largas mediante la preparación de ARN corto que esté sustancialmente libre de ARNbc más largos.

Las referencias respecto a ARNi: Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr. Biol* 11:1776-1780, 2001; Cullen, *Nat Immunol.* 3:597-599, 2002; Caplen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 98:9742-9747, 2001; Hamilton *et al.*, *Science* 286:950-952, 1999; Nagase *et al.*, *DNA Res.* 6:63-70, 1999; Napoli *et al.*, *Plant Cell* 2:279-289, 1990; Nicholson *et al.*, *Mamm. Genoma* 13:67-73, 2002; Parrish *et al.*, *Mol Cell* 6:1077-1087, 2000; Romano *et*

al., *Mol Microbiol* 6:3343-3353, 1992; Tabara *et al.*, *Cell* 99:123-132, 1999; y Tuschl, *ChemBiochem*. 2:239-245, 2001.

5 Paddison *et al.*, (*Genes & Dev.* 16: 948-958, 2002) han usado moléculas de ARN pequeñas plegadas en horquillas como un medio para efectuar ARNi. Por consiguiente, dichas moléculas de ARN en horquilla pequeñas (ARNhp) también se usan ventajosamente en los procedimientos de la revelación. La longitud del tallo y del bucle de los ARNhp funcionales es variable; la longitud de los tallos puede variar de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 nt, y el tamaño del bucle puede variar entre 4 y aproximadamente 25 nt sin afectar a la actividad de silenciamiento. Aunque no se desea quedar vinculados a ninguna teoría en particular, se cree que estos ARNhp se asemejan a los productos de ARNbc de la RNasa DICER y, en cualquier caso, tienen la misma capacidad para inhibir la expresión de un gen específico.

10 En algunos ejemplos de la realización, el ARNhp se expresa a partir de un vector lentiviral (pLL3.7) según lo descrito en el Ejemplo 1.

15 Se puede usar la tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de ADN o ARN antisentido, o a través de la formación de triple hélice. Las técnicas antisentido se describen, por ejemplo, en Okano, *J. Neurochem.* 56:560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice se trata, por ejemplo, en Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science* 251:1300 (1991). Los procedimientos se basan en la unión de un polinucleótido con un ADN o ARN complementario.

20 Por ejemplo, se puede usar la porción codificante 5' de un polinucleótido que codifica Sp35 para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción, evitando de este modo la transcripción y la producción de la proteína diana. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido diana.

25 En un ejemplo, los ácidos nucleicos antisentido específicos del gen Sp35 se producen intracelularmente mediante la transcripción desde una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN). Dicho vector puede permanecer episomal o integrarse cromosómicamente, siempre y cuando se pueda transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores se pueden construir mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser de plásmidos, virales u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y la expresión en células de vertebrados. La expresión de la molécula antisentido se puede realizar mediante cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de vertebrados, preferentemente, células humanas tales como las descritas en la presente memoria.

35 Aunque se prefiere la complementariedad absoluta de una molécula antisentido, no es necesaria. Una secuencia complementaria a al menos una parte de un ARN que codifique Sp35, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad como para poder hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable; se puede analizar la formación de tríplex. La capacidad para hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto mayor sea el ácido nucleico que se hibrida, más apareamientos erróneos de bases puede contener y seguir formando un dúplex estable (o tríplex, según el caso). El experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamientos erróneos mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

45 Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' de un ARN mensajero, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar más eficazmente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, las secuencias complementarias a las secuencias no traducidas 3' de ARNm han demostrado ser eficaces en la inhibición de la traducción de ARNm también. Véase, en general, Wagner, R., *Nature* 372: 333-335 (1994). Por lo tanto, los oligonucleótidos complementarios a regiones no codificantes no traducidas bien 5' o 3' se podrían usar en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de Sp35. Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida 5' del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificantes de ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces, pero se podrían usar según la revelación. Los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferentemente oligonucleótidos que varían de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

55 Los polinucleótidos para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria pueden ser ADN o ARN, o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido se puede modificar en el resto de base, resto de azúcar o estructura central de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de células huésped *in vivo*) o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652 (1987)); publicación PCT

n.º W088/09810, publicada el 15 de diciembre 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º W089/10134, publicada el 25 de abril, 1988), agentes de escisión activados por hibridación (Véase, por ejemplo, Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958-976 (1988)) o agentes intercalantes. (Véase, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549 (1988)). Con este fin, el oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agentes reticuladores activados por hibridación, agente de transporte, agentes de escisión activados por hibridación, etc.

Un oligonucleótido antisentido para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria puede comprender al menos un resto de base modificado que se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N-6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N-6-adenina, 7-metilguanina, 7-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3(3-amino-3-N2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

Un oligonucleótido antisentido para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otro ejemplo más, un oligonucleótido antisentido para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria comprende al menos una estructura central de fosfato modificada seleccionada del grupo que incluye, pero sin limitación, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

En otro ejemplo más, un oligonucleótido antisentido para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria es un oligonucleótido α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, contrariamente a la situación habitual, las cadenas son paralelas entre sí (Gautier *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641 (1987)). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148 (1987)) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.*, *FEBS Lett.* 215:327-330 (1987)).

Los polinucleótidos de la revelación se pueden sintetizar mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los que se encuentran disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos de fosforotioato se pueden sintetizar mediante el procedimiento de Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988), los oligonucleótidos de metilfosfonato se pueden preparar mediante el uso de soportes polímero de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:7448-7451 (1988)), etc.

Las composiciones de polinucleótidos para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria incluyen, además, ARN catalítico o una ribozima (Véase, por ejemplo, la publicación Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver *et al.*, *Science* 247: 1222-1225 (1990)). Se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo son ampliamente conocidas en la técnica, y se describen más detalladamente en Haseloff y Gerlach, *Nature* 334:585-591 (1988). Preferentemente, la ribozima se diseña genéticamente para que el sitio de reconocimiento de la escisión esté situado cerca del extremo 5' del ARNm diana; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

Como en el enfoque antisentido, las ribozimas para su uso en los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria se pueden componer de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, el direccionamiento, etc.) y se pueden administrar a las células que expresen Sp35 *in vivo*. Los constructos de ADN que codifican la ribozima se pueden introducir en la célula de la misma manera descrita anteriormente para la introducción de ADN que codifica antisentido. Un procedimiento de administración preferido implica el uso de un constructo de ADN "que codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte tal como, por ejemplo, promotor pol III o pol II, de manera que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir mensajes endógenos de Sp35 e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, por motivos de eficiencia, se requiere una menor concentración intracelular.

Vectores

Para producir antagonistas para su uso en los procedimientos de la revelación, también se pueden usar vectores que comprendan ácidos nucleicos que codifiquen antagonistas de Sp35. La elección del vector y las secuencias de

control de la expresión a las que se unen de forma funcional dichos ácidos nucleicos depende de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la expresión proteica y la célula huésped que se vaya a transformar.

5 Los elementos de control de la expresión para regular la expresión de una secuencia codificante ligada de forma funcional son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción y otros elementos reguladores. Cuando se usa un promotor inducible, se puede controlar, por ejemplo, mediante un cambio en el estado de los nutrientes o un cambio en la temperatura, en el medio de la célula huésped.

10 El vector puede incluir un replicón procariota, es decir, una secuencia de ADN que tenga la capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante de forma extra-cromosómica en una célula huésped bacteriana. Dichos replicones son ampliamente conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un replicón eucariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiera un marcador detectable tal como resistencia a un fármaco. Los ejemplos de genes bacterianos de resistencia a fármacos son aquellos que confieren resistencia a la ampicilina o la tetraciclina.

15 Los vectores que incluyen un replicón procariota también pueden incluir un promotor procariota o bacteriófago para dirigir la expresión de las secuencias génicas codificantes en una célula huésped bacteriana. Las secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos típicamente se proporcionan en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN que se vaya a expresar. Los ejemplos de dichos vectores plasmídicos son pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 (BioRad), pL y pKK223 (Pharmacia). Se puede usar cualquier huésped procariota adecuado para expresar una molécula de ADN recombinante que codifique una proteína usada en los procedimientos de la revelación.

25 A efectos de la presente revelación, se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se obtienen de virus animales tales como el virus del papiloma bovino, virus del poliovirus, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión al ribosoma internos. Además, se pueden seleccionar células que tengan integrado el ADN en sus cromosomas, mediante la introducción de uno o más marcadores que permitan la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como el cobre. El gen del marcador seleccionable se puede bien ligar directamente a las secuencias de ADN que se vayan a expresar o introducir en la misma célula mediante cotransformación. El gen de la fosfotransferasa de la neomicina (neo) es un ejemplo de un gen de marcador seleccionable (Southern *et al.*, *J. Mol. Anal. Genet.* 1:327-341 (1982)). También se pueden necesitar otros elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción.

35 En un ejemplo, se puede usar un vector de expresión propiedad de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA (patente estadounidense n.º 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador del citomegalovirus, el promotor principal de la beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y el exón 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen de la dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se ha descubierto que este vector genera un nivel de expresión muy elevado tras la transfección en células CHO, seguida de la selección en medio que contiene G418 y la amplificación con metotrexato. Por supuesto, en la presente revelación, se puede usar cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, PVAX1 y pZeoSV2 (disponible en Invitrogen, San Diego, CA) y plásmido pCI (disponible en Promega,

45 Madison, WI). En la técnica, se conocen otros vectores de expresión en células eucariotas que están disponibles comercialmente. Comúnmente, dichos vectores contienen sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Los ejemplos de vectores incluyen pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pm12d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), vector de expresión retroviral pMIG y pLL3.7, vector lanzadera de adenovirus pDC315 y vectores AAV. Otros sistemas de vectores ejemplares se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.413.777.

50 En general, el rastreo de un gran número de células transformadas en busca de las que expresen niveles adecuadamente elevados del antagonista es una experimentación rutinaria que se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante sistemas de robótica.

55 Las secuencias reguladoras usadas frecuentemente para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), el virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdmIP)), poliovirus y promotores potentes de mamífero tales como los promotores nativos de inmunoglobulina y actina. Para más información sobre los elementos reguladores virales, y las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, Stinski patente estadounidense n.º 5.168.062; Bell, patente

estadounidense n.º 4.510.245; y Schaffner estadounidense n.º 4.968.615.

5 Los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, Axel patentes estadounidenses n.º 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, lo común es que el gen marcador de selección confiera resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Frecuentemente, los genes marcadores de selección usados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

10 Los vectores que codifican antagonistas de Sp35 se pueden usar para la transformación de una célula huésped adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos para la introducción de ADN exógeno en células de mamífero son bien conocidos en la técnica, e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación en fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores virales.

20 La transformación de células huésped puede realizarse por procedimientos convencionales adecuados para el vector y la célula huésped empleados. Para la transformación de células huésped procarióticas, se pueden emplear procedimientos de tratamiento por electroporación y con sales (Cohen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 69:2110-2114 (1972)). Para la transformación de células de vertebrados, se pueden emplear procedimientos de tratamiento por electroporación, con lípidos catiónicos o sales. Véase, por ejemplo, Graham *et al.*, *Virology* 52:456-467 (1973); Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 76:1373-1376 (1979).

25 Lo más preferible es que la línea celular huésped usada para la expresión de proteínas proceda de un mamífero. Los expertos en la técnica cuentan con la capacidad de determinar preferentemente las líneas celulares huésped concretas que mejor se adapten al producto génico deseado que se vaya a expresar en las mismas. Los ejemplos de líneas celulares huésped incluyen, pero sin limitación, NSO, células SP2, células renales de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, menos DHFR), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto murino), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma murino), P3x63-Ag3.653 (mieloma murino), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las líneas de células huésped se obtienen comúnmente de proveedores comerciales, de la Colección Americana de Cultivos Tipo o de la bibliografía publicada.

35 La expresión de polipéptidos a partir de líneas celulares de producción puede potenciarse usando técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de glutamina sintetasa (GS) se usa habitualmente para potenciar la expresión en ciertas condiciones. Véanse, por ejemplo, las patentes europeas n.º 0216846, 0256055 y 0323997, y la solicitud de patente europea n.º 89303964.4.

Células Huésped

40 Las células huésped para la expresión de un antagonista de Sp35 para su uso en un procedimiento de la revelación pueden ser procarióticas o eucarióticas. Las células huésped eucarióticas ejemplares incluyen, pero sin limitación, células de levadura y de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (n.º de acceso a la ATCC CCL61), células embrionarias de ratón suizo NIH NIH-3T3 (n.º de acceso a la ATCC CRL1658) y células renales de cría de hámster (BHK). Otras células huésped eucarióticas útiles incluyen células de insecto y células vegetales. *E. coli* y *Streptomyces* son ejemplos de células huésped procariotas.

45 Terapia Génica

Es posible producir un antagonista de Sp35 *in vivo* en un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, usando un enfoque de terapia génica para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una lesión del sistema nervioso en el que sería terapéuticamente beneficioso potenciar la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de los oligodendrocitos, y potenciar la mielinización de las neuronas. Esto implica la administración de un ácido nucleico codificante de un antagonista de Sp35 adecuado ligado de forma funcional a secuencias de control de la expresión adecuadas. Generalmente, estas secuencias se incorporan en un vector viral. Los vectores virales adecuados para dicha terapia génica incluyen un vector adenoviral, un vector lentiviral, un vector alfaviral, un vector enteroviral, un vector pestiviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral, un vector del virus del herpes, un vector viral de Epstein Barr, un vector papovaviral, un vector del virus de la viruela, un vector del virus vaccinia, un vector viral adeno-asociado y un vector del virus del herpes simple. El vector viral puede ser un vector viral deficiente en la replicación. Comúnmente, se usan los vectores adenovirales que tienen una eliminación en su gen E1 o gen E3. Cuando se usa un vector adenoviral, el vector habitualmente carece de un gen marcador seleccionable.

Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas de Sp35 usados en los procedimientos de la revelación se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su administración a mamíferos, incluyendo seres humanos. Las composiciones farmacéuticas utilizadas en los procedimientos de la presente revelación comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones usadas en los procedimientos de la presente revelación se pueden administrar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por vía parenteral, intraventricular, oral, mediante pulverizado de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término "parenteral", como se usa en la presente memoria, incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Como se ha descrito anteriormente, los antagonistas de Sp35 usados en los procedimientos de la revelación actúan en el sistema nervioso para potenciar la supervivencia, proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos, así como la mielinización de las neuronas. Por consiguiente, en los procedimientos de la revelación, los antagonistas de Sp35 se administran de tal manera que crucen la barrera hematoencefálica. Este cruce puede ser el resultado de las propiedades físico-químicas inherentes a la propia molécula antagonista de Sp35, de otros componentes en una formulación farmacéutica o del uso de un dispositivo mecánico tal como una aguja, cánula o instrumentos quirúrgicos para atravesar la barrera hematoencefálica. Cuando el antagonista de Sp35 es una molécula que no cruza inherentemente la barrera hematoencefálica, por ejemplo, una fusión a un resto que facilite el cruce, las vías adecuadas de administración son, por ejemplo, intratecal o intracraneal, por ejemplo, directamente en una lesión crónica de EM. Cuando el antagonista de Sp35 es una molécula que cruza inherentemente la barrera hematoencefálica, la vía de administración puede ser por una o más de las diversas rutas descritas a continuación.

Las formas inyectables estériles de las composiciones usadas en los procedimientos de la presente revelación pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la materia usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación estéril inyectable puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una suspensión en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono-o di-glicéridos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente, en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleaginosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares comúnmente usados en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También se pueden usar otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables para los propósitos de formulación.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis única en bolo, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones se pueden administrar en determinados intervalos de tiempo fijos o variables, por ejemplo, una vez al día o "según sea necesario".

Ciertas composiciones farmacéuticas usadas en los procedimientos de la presente revelación se pueden administrar oralmente en una forma de dosificación aceptable, incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas se pueden administrar también mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se pueden preparar en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de un antagonista de Sp35 que se puede combinar con los materiales transportadores para producir una única forma de dosificación variará en función del huésped tratado, del tipo de antagonista usado y del modo particular de administración. La composición se puede administrar como una sola dosis, múltiples dosis o durante un período de tiempo establecido en una infusión. Las pautas de dosificación también se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

Los procedimientos de la revelación usan una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un antagonista de Sp35. Dicha cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz puede variar de acuerdo

con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo. Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

5 La dosificación y pauta de dosificación específicas para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el antagonista de Sp35 usado en particular, la edad del paciente, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta, así como el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando en particular. La valoración de dichos factores por parte de profesionales de la atención sanitaria pertenece al ámbito de la técnica. La cantidad también dependerá del
10 paciente individual que se vaya a tratar, de la vía de administración, del tipo de formulación, de las características del compuesto usado, de la gravedad de la enfermedad y del efecto deseado. La cantidad usada se puede determinar mediante principios farmacológicos y farmacocinéticos ampliamente conocidos en la técnica.

En los procedimientos de la revelación, los antagonistas de Sp35, en general, se administran directamente en el sistema nervioso, intracerebroventricular o intratecalmente, por ejemplo, en una lesión crónica de EM. Las composiciones para su administración de acuerdo con los procedimientos de la revelación se pueden formular de
15 manera que se administre una dosis de 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal al día del antagonista de Sp35. En algunos casos de la revelación, la dosis es de 0,01-1,0 mg/kg de peso corporal al día. En algunos casos, la dosis es de 0,001 a 0,5 mg/kg de peso corporal al día.

Para el tratamiento con un anticuerpo antagonista de Sp35, la dosificación puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente, de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25
20 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) de peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosis pueden ser de 1 mg/g de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente, al menos 1 mg/kg. También pertenecerán al alcance de la revelación las dosis intermedias de los intervalos anteriores. Los sujetos pueden recibir dichas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otra programación determinada por el análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración
25 en múltiples dosis durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, de al menos seis meses. Otras pautas de dosificación ejemplares implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con especificidades de unión diferentes, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo
30 administrado está dentro de los intervalos indicados.

En ciertos casos, un sujeto se puede ser tratar con una molécula de ácido nucleico que codifique un polinucleótido antagonista de Sp35. Las dosis para los ácidos nucleicos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, de 1 µg a 10 mg o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10 a 100 o más viriones por dosis.

35 También se pueden incorporar compuestos activos complementarios a las composiciones usadas en los procedimientos de la revelación. Por ejemplo, es posible coformular y/o coadministrar un polipéptido Sp35 soluble o una proteína de fusión con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La revelación abarca cualquier procedimiento de administración adecuado para un antagonista de Sp35 a un tejido diana seleccionado, incluyendo la inyección en bolo de una solución acuosa o la implantación de un sistema de liberación controlada. El uso de un implante de liberación controlada reduce la necesidad de repetir las inyecciones.
40

Los antagonistas de Sp35 usados en los procedimientos de la revelación se pueden infundir directamente en el cerebro. Se conocen diversos implantes para la infusión cerebral directa de los compuestos, y son eficaces en la administración de compuestos terapéuticos a pacientes humanos que tienen trastornos neurológicos. Estos incluyen la infusión crónica en el cerebro mediante una bomba, catéteres temporales intersticiales implantados estereotácticamente, catéteres permanentes intracraneales e implantes biodegradables implantados quirúrgicamente. Véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *supra*; Scharfen *et al.*, "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(4):583-591 (1992); Gaspar *et al.*, "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas", *Int. J. Radiation Oncology Biol.* 43 (5):977-982 (1999); Capítulo 66, páginas 577-580, Bellezza *et al.*, "Stereotactic Interstitial Brachytherapy", en Gildenberg *et al.*, "Textbook of Stereotactic and
45 Funcional Neurosurgery", McGraw-Hill (1998); y Brem *et al.*, "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial", *J. Neuro-Oncology* 26:111-23 (1995).
50

[Las composiciones también pueden comprender un antagonista de Sp35 dispersado en un material transportador biocompatible que funcione como un sistema de administración o soporte adecuado para los compuestos. Los ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados tales como supositorios o cápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.319; EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22:547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), etilvinilacetato (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982)) o
55

ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

En algunos ejemplos de la revelación, se administra un antagonista de Sp35 a un paciente por infusión directa en una región apropiada del cerebro. Véase, por ejemplo, Gill *et al.*, "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease", *Nature Med.* 9:589-95 (2003). Hay técnicas alternativas disponibles, y se pueden aplicar en la administración de un antagonista de Sp35 según la revelación. Por ejemplo, se puede realizar la colocación estereotáctica de un catéter o un implante usando la unidad de Riechert-Mundinger y la unidad localizadora de usos múltiples ZD (Zamorano-Dujovny). Una tomografía computarizada con contraste (TC), inyectando 120 ml de omnipaque, 350 mg de yodo/ml, con 2 mm de grosor de corte puede permitir la realización de una planificación del tratamiento multiplanar tridimensional (STP, Fischer, Freiburg, Alemania). Este equipo permite la planificación en base a estudios de resonancia magnética, uniendo la información obtenida mediante TC y MRI para obtener una confirmación clara.

El sistema estereotático de Leksell (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) modificado para su uso con un escáner TC de GE (General Electric Company, Milwaukee, WI), así como el sistema estereotático de Brown-Roberts-Wells (BRW) (Radionics, Burlington, MA) se pueden usar para este propósito. Así pues, la mañana del implante, se puede fijar el anillo de base anular del marco estereotático de BRW al cráneo del paciente. Es posible obtener secciones de TC en serie en intervalos de 3 mm a través de la región (tejido diana) con un marco localizador de varilla de grafito fijado a la placa base. Se puede ejecutar un programa de planificación de tratamiento informatizado en un ordenador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, MA) usando las coordenadas de TC de las imágenes de la varilla de grafito para mapear entre el espacio del TC y el espacio del BRW.

Comúnmente, los procedimientos de tratamiento de los trastornos de desmielinización o dismielinización según lo descrito en la presente memoria se prueban *in vitro* y luego *in vivo* en un modelo animal aceptable para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los modelos animales adecuados, incluyendo los animales transgénicos, son ampliamente conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, en la presente memoria, se describen ensayos *in vitro* para demostrar el efecto sobre la diferenciación y la supervivencia de los antagonistas de Sp35. El efecto de los antagonistas de Sp35 en la mielinización de los axones se puede analizar *in vitro* según lo descrito en los ejemplos. Finalmente, se pueden realizar pruebas *in vivo* mediante la creación de ratones transgénicos que expresen el antagonista de Sp35 o mediante la administración del antagonista de sp35 a ratones o ratas en los modelos según lo descrito en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Sp35 está implicado en la biología de los oligodendrocitos

Los oligodendrocitos maduros pasan por varias etapas de desarrollo partiendo de las células progenitoras A2B5 (que expresan a A2B5), la diferenciación en oligodendrocitos pre-mielinizantes (que expresan a O1 y O4) y, finalmente, la conversión en oligodendrocitos maduros mielinizantes (que expresan a O1, O4 y MBP). Por lo tanto, mediante controlando la presencia y la ausencia de los marcadores A2B5, O1, O4 y MBP, es posible determinar la etapa de desarrollo de una célula dada y evaluar el papel de sp35-Fc en la biología de los oligodendrocitos. Para una revisión general de la biología de los oligodendrocitos, véase, por ejemplo, Baumann y Pham-Dinh, *Physiol. Rev.* 81: 871-927 (2001).

Los anticuerpos monoclonales contra O4, MBP y CNPasa se obtuvieron en Stemberger Monoclonals; el anticuerpo contra APC (clon CC-1; Ref 29) se obtuvo en Calbiochem. Otros anticuerpos eran anticuerpos contra la tubulina β III (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa Cruz Biotechnology) y fosfo-Fyn (Biosource). Los anticuerpos monoclonales contra A2B5 están disponibles en Chemicon.

Sp35 se expresa en oligodendrocitos

Se analizó la expresión de Sp35 en cultivos purificados de neuronas CG P13 de rata, oligodendrocitos P2 y astrocitos P4 mediante la reacción en cadena de la polimerasa tras la transcripción inversa (RT-PCR). Se usó un kit de Ambion, Inc. para extraer ARNm de las células de cerebro de rata según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una RT-PCR semicuantitativa usando el cebador directo 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (SEC ID N.º 38), y el cebador inverso 5' AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (SEC ID N.º 39) que demostró una alta expresión en las neuronas, una menor expresión en los oligodendrocitos y una expresión nula en los astrocitos. (Fig. 5).

La expresión de Sp35 en los oligodendrocitos se confirmó mediante la hibridación *in situ* en secciones derivadas de nervio óptico de rata adulta. Las secciones del nervio óptico de rata se prepararon y se procesaron según lo descrito en Mi *et al.*, "Sp35 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex", *Nat. Neurosci.* 7:221-28 (2004) y se sondearon con ARN sentido o antisentido de Sp35 marcados con digoxigenina usando los 500 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de Sp35. Se tiñeron las secciones según las instrucciones del fabricante usando un kit de amplificación de señales de tiramida (Amersham Biosciences) y un kit de anticuerpos conjugados anti-digoxigenina fluorescentes (Perkin Elmer). Para los análisis *in situ* y de inmunofluorescencia combinados, primero se sondaron las secciones con ARN marcado con digoxigenina y luego con anticuerpos, por ejemplo,

anticuerpo contra CC1 (Calbiochem; un marcador de oligodendrocitos maduros) o anticuerpo anti-Sp35. Se ha observado que los oligodendrocitos que se hibridaron con una sonda de Sp35 antisentido también se co-tiñeron con un anticuerpo contra CC1 (datos no mostrados). No se observó un marcaje específico usando una sonda sentido de Sp35. La expresión de Sp35 en los oligodendrocitos también se confirmó mediante estudios de inmunohistoquímica de secciones tisulares de la región lateral del ventrículo de corteza de rata P7. La mayoría de las células corticales que se marcaron con anticuerpo contra CC1 también se marcaron con anticuerpo anti-Sp35. No se muestran datos. La especificidad de la interacción se confirmó mediante preadsorción del anticuerpo anti-Sp35 con Sp35-Fc (véase el Ejemplo 2), lo que eliminó la señal.

La desactivación de ARNi específico de Sp35 de la expresión de Sp35 potencia el crecimiento y la diferenciación de los oligodendrocitos

Se usó ARNi específico de Sp35 para permitir la expresión de Sp35 en células precursoras de oligodendrocitos con el fin de examinar cómo contribuye Sp35 al crecimiento y a la diferenciación de los oligodendrocitos. Se infectaron 50.000 células precursoras de oligodendrocitos A2B5 con lentivirus que portaba la secuencia de ARNi específico de Sp35 o ARNi control preparado de la siguiente manera.

Se compararon las secuencias de ADN de Sp35 murina y de rata para encontrar regiones homólogas para su uso como ARN en horquilla pequeños (ARNhp) candidatos. Se construyó CH324 para la expresión lentiviral de ARNi de Sp35 mediante el apareamiento de los oligonucleótidos LV1-035 y LV1-036, y la unión a pLL3.7 digerido por *HpaI* y *XhoI*. El vector pLL3.7, la metodología adicional y la producción de virus se realizaron según lo descrito en Rubinson *et al.*, *Nat. Genet.* 33,401-06 (2003). Los oligonucleótidos ARNi de Sp35 se adquirieron en MWG y tienen las siguientes secuencias:

LV1-035 (oligo sentido) 5'-TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTTC-3'
(SEC ID N.º 40) y LV1-036 (oligo antisentido) 5'-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTCTAGCAGGATGACGATCA-3' (SEC ID N.º 41).

El ARNi control se diseñó con las mismas secuencias de oligonucleótidos, a excepción de los cambios de nucleótidos indicados con las letras en minúscula: 5'-TGATCcTCATcCtTACTTCAAGAGAGTgTAGCAGGATGAcGATCTTTTTTCTCGA-3' (SEC ID N.º 42) y 5'-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTaTAGaAGGATGACGATCA-3' (SEC ID N.º 43).

Antes de producir el lentivirus, se cotransfectaron el ADN de pLL3.7 o el ARNhp candidato de pLL3.7 con plásmido marcado con sp35-HA murino en una proporción de 5 a 1 en células CHO en un formato de 6 pocillos. Se analizó la desactivación mediante la detección de transferencia Western del marcador de sp35-HA en lisados de células CHO transfectadas, así como mediante transferencia Northern del ARN total preparado en pocillos por duplicado. La transferencia se sondó con un fragmento de ADNc de Sp35. Los ensayos se realizaron 48 horas después de la transfección. Como era de esperar, se produjo una reducción 10 veces mayor del ARNm de Sp35 en las células CHO tratadas con ARNi de CH324 en comparación con las células tratadas con control. No se muestran datos. Se generaron lentivirus de ARNi que portaban la proteína verde fluorescente (GFP) según lo descrito en Rubinson *et al.* En los cultivos tratados bien con el control o con ARNi de Sp35, aproximadamente el 80% de los oligodendrocitos resultaron ser positivos en GFP. El número total de células no fue alterado por los tratamientos de ARNi. Para cuantificar los efectos del ARNi en la diferenciación, sólo se contaron los oligodendrocitos que expresaron la GFP.

Se cultivaron poblaciones enriquecidas de oligodendrocitos de ratas P2 Long Evans hembra según lo descrito por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press; 1990) con las siguientes modificaciones. En síntesis, se disecó el prosencéfalo y se colocó en solución salina tamponada de Hank (HBSS; Invitrogen). Se cortó el tejido en fragmentos de 1 mm y se incubó a 37°C durante 15 min en tripsina al 0,01% y 10 µg/ml de DNasa. Las células disociadas se sembraron en matraces de cultivo tisular T75 revestidos con poli-L-lisina y se cultivaron a 37°C durante 10 días en medio DMEM con suero bovino fetal al 20% (Invitrogen). Se recogieron los precursores de oligodendrocitos (A2B5⁺) agitando el matraz durante una noche a 200 rpm y a 37°C, resultando en una población con un 95% de pureza. Se mantuvieron los cultivos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) rico en glucosa con FGF/PDGF (10 ng/ml; Peprotech) durante 1 semana. La eliminación del FGF/PDGF permitió la diferenciación de las células A2B5⁺ en oligodendrocitos premielinizantes O4⁺ tras 3-7 días, y la diferenciación en oligodendrocitos maduros O4⁺ y MBP⁺ tras 7-10 días. Estos estados de diferenciación se evidencian con los cambios en la morfología: las células A2B5⁺ tienen forma bipolar, los oligodendrocitos premielinizantes O4⁺ tienen procesos más largos y más ramificados, y los oligodendrocitos maduros MBP⁺ contienen estructuras de láminas de mielina entre los procesos.

Se infectaron células precursoras de oligodendrocitos A2B5 con el lentivirus que contenía el ARNi de CH324. Las células resultantes se cultivaron durante 3 días y se contó el número de oligodendrocitos O4 positivos (un marcador para la diferenciación de los oligodendrocitos). La expresión de Sp35 endógeno se redujo por la infección con lentivirus de ARNi de Sp35, y se confirmó mediante RT-PCR (Fig. 6A). La reducción de Sp35 produjo oligodendrocitos maduros más diferenciados en comparación con las células infectadas con el control, como se evidenció mediante los aumentos en la longitud de los procesos celulares y la presencia de abundantes estructuras de láminas de mielina (datos no mostrados). En las células que expresaron ARNi de Sp35 había tres veces más oligodendrocitos maduros (O4-positivos) que en los cultivos de control (Fig. 6B). Estos datos indican que sp35 puede

regular negativamente la diferenciación de los oligodendrocitos.

El Sp35 negativo dominante potencia el crecimiento y la diferenciación de los oligodendrocitos

Se construyeron vectores lentivirales que expresaban el tipo natural y una forma dominante negativa de Sp35. Se amplificó la secuencia de ADN codificante de Sp35 murino de longitud completa (FL-Sp35, residuos de aminoácidos 34-614 de la SEC ID N.º 2) mediante PCR usando los cebadores 5'-GAGGATCTCGACGCGCCGCATGGAGACAGACACTCCTG-3' (SEC ID N.º 44) y 5'-GGGGCGGAATTGGATCCTCACAGATCCTTCTGAGATGAG-3' (SEC ID N.º 45) y se insertó en el vector lentiviral HRST-IRESeGFP en los sitios de *NotI* y *Bam*HI. Del mismo modo, se amplificó la secuencia de ADN codificante de Sp35 dominante negativo (DN-Sp35, residuos de aminoácidos 34-581 de la SEC ID N.º 2) mediante PCT usando los cebadores 5'-GAGGATCTCGACGCGCCGCATGGAGACAGACACTCCTG-3' (SEC ID N.º 46) y 5'-GATACGGATCCTCAGCCTTTGCCCGGCTCCATAGAAACAGC-3' (SEC ID N.º 47). Se transfectaron los plásmidos FL-Sp35 y DN-Sp35 en células 293 para producir lentivirus según lo descrito por Rubinson *et al.*, "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference", *Nat. Genet.* 33: 401-06 (2003). Se infectaron los oligodendrocitos (preparados según lo descrito en el Ejemplo 4) con lentivirus a 2 Mdl por célula y se confirmó la expresión de FL-Sp35 y DN-Sp35 mediante transferencia Western.

DN-Sp35 promovió la diferenciación de los oligodendrocitos, produciendo un aumento en el número de oligodendrocitos maduros. Por el contrario, la sobreexpresión de Sp35 de longitud completa (FL-Sp35) tuvo el efecto opuesto e inhibió la diferenciación, tal y como se evidenció mediante una reducción en el número de oligodendrocitos maduros en comparación con el control (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Construcción y purificación de proteína de fusión Sp35-Fc

Se creó un constructo mediante la fusión de la porción extracelular de Sp35 humano (residuos 1-532) con la región bisagra y Fc de IgG1 humana con el fin de estudiar la función biológica de Sp35. Se obtuvo una secuencia codificante parcial de Sp35 humano mediante PCR a partir del clon 227.2 usando el cebador directo 5'-CAGCAGGTGACGCGCCGCATGCTGGCG GGGGGCGT-3' (SEC ID N.º 48) y el cebador inverso 5'-CAGCAGGTGACCTCGCCCGGCTGTTGGCCAACAGCCGGGCGAGGTCGACCTCGAGG-3' (SEC ID N.º 49).

Se subclonó el producto de la PCR con extremos romos en el sitio *SrfI* del vector PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para crear PCR SCRIPT AMP-sp35. Se aisló un fragmento *SalI* se aisló de PCR SCRIPT AMP-Sp35 y se subclonó en el vector PCRCAMP Ig (obtenido del vector de Stratagene PCR SCRIPT AMP). En el vector PCRCAMP Ig, se subclonó la secuencia de la bisagra y Fc gamma como un fragmento de *SalI* (5') a *NotI* (3'). Se subclonó el fragmento de Sp35 de *SalI* en el sitio *SalI* del vector PCRCAMP Ig, fusionando así la secuencia señal de Sp35 con el dominio extracelular (codones 1 a 532) en marco con secuencias codificantes de la región bisagra y Fc de Ig1 humano. Se identificaron aislados correctos, y se subclonó un fragmento *NotI* que abarcaba el fragmento Fc de Sp35 en el único sitio de clonación *NotI* del vector de expresión CHO, PV90 (Biogen Idec). El plásmido resultante se confirmó mediante secuenciación de ADN, y se designó GT123.

Se generaron líneas celulares estables que expresaban la proteína de fusión sp35-Fc mediante la electroporación de células huésped CHO DG44 con el plásmido GT123. Se cultivaron las células transfectadas en MEM menos alfa en presencia de suero sometido a diálisis al 10% y glutamina 4mM para seleccionar el crecimiento independiente del nucleósido. Catorce días después de la transfección, se suministró a las células medio recién preparado. Para la detección de las células que expresaban sp35-Fc, se marcaron las células CHO con IgG anti-humana de cabra marcada con ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) y se sometieron a clasificación de citometría de flujo de alta velocidad en un Mo-Flo de FACS (Cytomation). Se seleccionaron las células que expresaron los niveles más altos de sp35-Fc. Se expandieron estas células en cultivo durante 7 días, y a continuación, se volvieron a marcar y a clasificar. Las células que expresaban los niveles más altos de sp35-Fc se aislaron como clones individuales en placas de 96 pocillos. Se cultivaron estos clones durante dos semanas, tras lo que se les suministró medio recién preparado un día antes del análisis de FACS para comprobar los niveles de expresión. Se expandieron los clones que expresaban los niveles más altos de Sp35-Fc, y se establecieron bancos de células congeladas. Se adaptaron las líneas celulares al crecimiento en cultivo en suspensión en los medios BCM16 libres de suero. Se determinó la valoración del Sp35-Fc producido por estos clones mediante el cultivo de líneas celulares a 37°C durante 4-5 pasos, después el cultivo de las células a una densidad celular máxima del 50% y el cultivo durante 10-15 días a 28°C hasta que la densidad de células viables bajó al 75%. En este momento, se recogieron los medios de cultivo, se limpiaron de células y desechos mediante centrifugación, y se valoraron los sobrenadantes de cultivo en cuanto a los niveles de Sp35-Fc mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo Ig anti-humano (Jackson Lab) como sonda.

La proteína de fusión Sp35-Fc se purificó del medio de cultivo aclarado de la siguiente manera: se añadieron 9 ml de HEPES 1M, pH 7,5, a 900 ml de medio acondicionado. El medio se cargó por lotes durante 3 horas a 4°C en 3 ml de Proteína A Sefarosa (Amersham Bioscience). Se recogió la resina en una columna de 1,5 cm (D.I.) y se lavó cuatro

veces con 3 ml de PBS, dos veces con 4 ml de PBS que contenía NaCl 800mM, y después de nuevo con 3 ml de PBS. Se eluyó Sp35-Fc de la columna con NaH₂PO₄ 25mM, pH 2,8, y NaCl 100mM en fracciones de 1,5 ml, y se neutralizó mediante la adición de 75 µl de NaH₂PO₄ 25mM, pH 8,6. Se identificaron las fracciones que contenían los picos proteicos mediante absorbancia a 280 nm, se combinaron y se sometieron a purificación adicional en una columna de 1 ml de proteína A. Antes de la carga, se añadió NaCl a 600mM y HEPES, pH 7,5, a 50 mM. Se lavó la columna dos veces con 600 µl de HEPES 10mM, pH 7,5, y NaCl 1M, y después con 1 ml de PBS. Se eluyó la Sp35-Fc de la columna con NaH₂PO₄ 25mM, pH 2,8, y NaCl 100mM, recogiendo fracciones de 0,5 ml, y se neutralizó mediante la adición de 25 µl de NaH₂PO₄ 0,5mM, pH 8,6. Se identificaron las fracciones que contenían los picos proteicos mediante absorbancia a 280 nm y se combinaron. Mediante SDS-PAGE reductora, la proteína Sp35-Fc migró como una única banda (> 95% de pureza) con una masa aparente de 90 kDa. En condiciones no reductoras, la proteína se procesó en forma de un dímero con una masa aproximada de 180 kDa. Se formaron alícuotas de la proteína Sp35-Fc purificada y se almacenaron a -70°C.

Ejemplo 3

La Sp35-Fc exógena potencia la supervivencia/proliferación/diferenciación de los oligodendrocitos

Se evaluó la expresión de ARNm de Sp35 en oligodendrocitos en diversas etapas de desarrollo mediante el siguiente procedimiento. Se indujeron los oligodendrocitos a diferenciarse según lo descrito en el Ejemplo 1, y se aisló el ARNm usando el kit Ambion. La cuantificación de la expresión del ARNm de Sp35 se llevó a cabo usando el kit de RT-PCR Taqman® (Applied Biosystems) según las especificaciones del fabricante, usando los siguientes cebadores: 5'-CTTTCCCTTCGACATCAAGAC-3' (directo; SEC ID N.º 50) y 5'-CAGCAGCACCAGGCAGAA-3' (inverso; SEC ID N.º 51); y una sonda marcada con FAM, 5'-ATCGCCACCACCATGGGCTTCAT-3' (SEC ID N.º 52).

Los datos se normalizaron a los niveles de GAPDH como control interno. Los oligodendrocitos progenitores tempranos (A2B5⁺) y los oligodendrocitos pre-mielinizantes (O4⁺) mostraron niveles equivalentes de ARNm de Sp35, pero el nivel de ARNm de Sp35 fue más del doble en los oligodendrocitos maduros (MBP⁺). Fig. 7.

Los oligodendrocitos A2B5⁺, preparados según lo descrito en el Ejemplo 1, se trataron con concentraciones crecientes de Sp35-Fc o control-Fc durante 3 días (la Sp35-Fc se preparó según lo descrito en el Ejemplo 2). Para evaluar la diferenciación, se sembraron las células A2B5⁺ en cámaras de portaobjetos de 4 pocillos en medio de crecimiento libre de FGF/PDGF complementado con 10 ng/ml de CNTF y triiodo-L-tironina 15nM, y se trataron inmediatamente con concentraciones crecientes de sp35-Fc o control-Fc. Tras 48 h (72 h para el ARNi), se tiñeron los cultivos con anticuerpo contra O4, y se cuantificó el número de oligodendrocitos totales O4⁺ y maduros O4⁺. Las muestras se analizaron por duplicado. Sp35-Fc promovió la diferenciación de células A2B5⁺ en células O4⁺ de una manera dependiente de la concentración. Fig. 8.

Los oligodendrocitos maduros tienen una semivida *in vitro* de aproximadamente 48 a 72 horas, siendo comúnmente las células sometidas a apoptosis tras 72 horas. Cuando se trataron los cultivos de oligodendrocitos con Sp35-Fc (10 g/ml durante 5 días), se observó una tasa de supervivencia significativamente mayor para los oligodendrocitos maduros, a juzgar por la tinción de viabilidad celular, en comparación con el grupo control tratado con control-Fc. Se monitorizó la expresión de MBP como un marcador de los oligodendrocitos maduros. Se observó un aumento aproximadamente 3 veces superior en la expresión de la proteína MBP en las células tratadas con Sp35-Fc mediante tinción celular y transferencia Western usando anticuerpo anti-MBP en comparación con las células tratadas con control-Fc.

Ejemplo 4

Los antagonistas de Sp35 regulan RhoA y Fyn

Un buen candidato como vía de señalización implicada en el control de la diferenciación de los oligodendrocitos es la familia de las GTPasas Rho. Las GTPasas Rho regulan la morfología celular, y se requieren cantidades reducidas de RhoA-GTP para la diferenciación de los oligodendrocitos. Véase Liang, X, *et al.*, *J. Neurosci.* 24:7140-7149 (2004). Para determinar si Sp35 se señala por la ruta de RhoA, se compararon los niveles de RhoAGTP en lisados de células de oligodendrocitos tratados con Sp35-Fc con los niveles observados en el control correspondiente a través mediante transferencia Western. Se observó una significativa reducción del triple en RhoA-GTP después de Sp35-Fc (Fig. 9A), lo que indica que la atenuación de la función de Sp35 puede provocar la diferenciación de los oligodendrocitos mediante la infrarregulación de RhoA-GTP, con un posterior aumento de la expresión de MBP. Se observaron reducciones similares en las cantidades de RhoA-GTP cuando se trataron los oligodendrocitos con DN-Sp35 o con ARNi de Sp35 (datos no mostrados).

La actividad de la GTPasa RhoA está regulada por la quinasa Fyn. Véase Liang, X, *et al.*, *J. Neurosci.* 24:7140-7149 (2004). El aumento de la expresión y la fosforilación de Fyn guarda correlación con la diferenciación de los oligodendrocitos. Id. Véase también Osterhout, D. J., *et al.*, *J. Cell Biol.* 145:1209-1218 (1999). Para probar si los antagonistas de Sp35 afectan a la función de Fyn, se midieron directamente la expresión y la fosforilación de Fyn mediante transferencia Western. El tratamiento con DN-Sp35 según lo descrito en el Ejemplo 1, produjo aumentos del doble en la proteína Fyn y en la fosforilación de Fyn (Fig. 9B). Por el contrario, cuando se analizaron las células que expresaban FL-Sp35, se observó una reducción del doble en la expresión y la fosforilación de Fyn (Fig. 9B).

Ejemplo 5

Sp35-Fc potencia la mielinización *in vitro*

Se examinó el papel de Sp35 en la mielinización *in vitro* mediante el tratamiento de cocultivos de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (GRD) y oligodendrocitos con Sp35-Fc, y se probó la mielinización mediante microscopía electrónica e inmunohistoquímica. Para estos estudios, fue necesario generar primero cultivos primarios de neuronas de GRD y de oligodendrocitos.

Se cultivaron ganglios de raíz dorsal de embriones E14-E17 de rata Long Evans hembra según lo descrito por Plant *et al.*, *J. Neurosci.* 22: 6083-91 (2002). Se sembraron los GRD diseccionados en portaobjetos cubiertos revestidos de poli-L-lisina (100 µg/ml) durante 2 semanas en presencia de fluorodesoxiuridina durante los días 2-6 y los días 8-11 en un medio NLA que contenía 1 x B27, 100 ng/ml de NGF (Invitrogen).

Los oligodendrocitos A2B5⁺ se prepararon según lo descrito en el Ejemplo 1, y se cosecharon mediante tripsinización.

Para los estudios de cocultivo, se añadieron oligodendrocitos A2B5⁺ a cultivos de gotas de neuronas de GRD en presencia o en ausencia de 10 µg/ml de Sp35-Fc. Se cambió el medio de cultivo (medio Neurobasal complementado con B27 y 100 ng/ml de NGF), y se añadió sp35-Fc recién preparada a las células cada 3 días. Para identificar los cambios en la mielinización, se tiñeron cultivos preparados hacía 2 semanas mediante tinción inmunohistoquímica ("IHC") de neurofilamentos con anticuerpo anti-tubulina βIII para identificar los axones, o anticuerpo anti-MBP para identificar los oligodendrocitos, y se sometieron cultivos preparados hacía 4 semanas a SDS-PAGE seguida de un análisis de transferencia Western para cuantificar la MBP. En los ejemplos seleccionados, se fijaron las células para estudios de microscopía electrónica mediante la adición de glutaraldehído al 2,5% directamente sobre los portaobjetos. Se cuantificaron los axones mielinizados en cultivos preparados hacía 2 semanas contando el número de haces internodales mielinizadas que se obtuvieron de oligodendrocitos MBP⁺ individuales. Las muestras se analizaron por duplicado. Las barras de error indican las determinaciones individuales. Los valores de P de todos los estudios se determinaron usando un análisis unidireccional de la varianza.

En cultivos de oligodendrocitos primarios de rata y neuronas de ganglio de la raíz dorsal (GRD), se observaron bajas cantidades de mielinización de referencia. Por el contrario, el tratamiento con Sp35-Fc durante 2 semanas produjo una potente mielinización axonal, como fue evidenciado por la presencia de axones mielinizados MBP⁺, que se desarrollaron en cultivos tratados con Sp35-Fc de una manera dependiente de la dosis (Fig. 10A). El análisis de transferencia Western demostró que la expresión de MBP, el componente proteico principal de la mielina, aumentó en cultivos tratados con Sp35-Fc (Fig. 10B). La mielinización en presencia de Sp35-Fc se confirmó además mediante microscopía confocal, que verificó que MBP había encapsulado los axones (datos no mostrados). Se observaron múltiples internodos bien formados mediante microscopía electrónica en cultivos tratados con Sp35-Fc, así como estructuras que se asemejaban bastante a los nodos de Ranvier (Fig. 10C). En los cultivos de control, sólo se detectaron algunos segmentos mielinizados ocasionales y ningún nodo de Ranvier (Fig. 10D).

El efecto de los antagonistas de Sp35 en la mielinización axonal se confirmó además con DN-Sp35. La expresión de DN-Sp35 aumentó el número total de células mielinizantes MBP⁺ de cinco a diez veces en comparación con los controles (Fig. 10E). Por el contrario, la sobreexpresión de FL-Sp35 disminuyó el doble el número de células mielinizantes MBP⁺ en comparación con los controles (Fig. 10E). Se usó el análisis de transferencia Western para cuantificar la MBP en los cultivos. DN-Sp35 produjo un aumento de diez veces de la MBP, mientras que FL-Sp35 provocó una reducción de MBP del doble (Fig. 10F). La expresión de proteínas FL-Sp35 y DN-Sp35 en cultivos se confirmó mediante transferencia Western (Fig. 10F). Estos estudios indican además que Sp35 endógeno inhibe la mielinización y que el antagonismo de Sp35 puede invertir la inhibición.

Ejemplo 6

Los péptidos con dominio Ig de Sp35 potencian la mielinización *in vitro*

Se examinaron *in vitro* varios péptidos que contenían porciones del dominio Ig de Sp35 mediante el tratamiento de cocultivos de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (GRD) y oligodendrocitos con péptidos Ig de Sp35 y el análisis de la mielinización según lo descrito en el Ejemplo 5.

Para los estudios de cocultivo, se añadieron oligodendrocitos A2B5⁺ a cultivos de gotas de neuronas de GRD en presencia o en ausencia de 10 µg/ml de Sp35-Ig-Fc (aminoácidos 417-493 de Sp35 fusionados a Fc). Se cambió el medio de cultivo (medio Neurobasal complementado con B27 y 100 ng/ml de NGF) fue cambiada, y se añadió Sp35-Ig-Fc recién preparada a las células cada 3 días. Para identificar los cambios en la mielinización, se tiñeron cultivos preparados hacía 2 semanas mediante tinción inmunohistoquímica ("IHC") de neurofilamentos con anticuerpo anti-tubulina βIII para identificar los axones, o anticuerpo anti-MBP para identificar los oligodendrocitos, y se sometieron cultivos preparados hacía 4 semanas a SDS-PAGE seguida de un análisis de transferencia Western para cuantificar la MBP.

El análisis de transferencia Western demostró que la expresión de MBP, el componente proteico principal de la

mielina, se aumentó en los cultivos tratados con Sp35-Ig-Fc (Fig. 15). También se analizó un péptido SP35-Ig-Fc mutado en el mismo ensayo. Cuando se mutaron la arginina de la posición 456 y la histidina de la posición 458 a ácido glutámico y valina, respectivamente, los péptidos no promovieron la mielinización en comparación con el péptido Sp35-Ig-Fc (Fig. 15). La arginina de la posición 456 es parte del "bucle RKH" (aminoácidos 456-458 de arginina-lisina-histidina) en el dominio Ig de Sp35 y se cree que es importante para la unión al polipéptido antagonista de Sp35. El aumento de la proteína MBP en presencia de Sp35-Fc de Ig es comparable al aumento de la proteína de MBP en presencia de la molécula de Sp35-Fc. (Fig. 15).

También se analizó la capacidad de los péptidos cíclicos que contienen porciones del dominio Ig de Sp35 para promover la mielinización en el ensayo descrito en el Ejemplo 5. Se cicló el péptido Sp35 LSPRKH (aminoácidos 454 a 458) (SEC ID N.º 61) mediante la adición de una cisteína en el extremo N-terminal y un residuo de cisteína en el extremo C-terminal. Se colocó en el péptido un casquete de un grupo acetilo (Ac) en el grupo N-terminal y un resto NH₂ en su extremo C-terminal. Además, el péptido LSPRKH (SEC ID N.º 61) también se sintetizó con un grupo de biotina unido por el ligador de aminoácidos GSGC en el extremo N-terminal y un residuo de cisteína NH₂ en el extremo C-terminal, y se cicló. Los péptidos Sp35 péptidos cíclicos resultantes, Ac-CLSPRKH (SEC ID N.º 66) y biotina-GSGCLSPRKH (SEC ID N.º 63) aumentaron la expresión de MBP, el componente proteico principal de la mielina, en los cultivos tratados como se muestra en las transferencias Western. (Fig. 16). Se usaron otros péptidos cíclicos como controles: biotina-GSGCLSPEKVC (SEC ID N.º 65), biotina-GSGCKHSPLRC (SEC ID N.º 64) y Ac-CLSPEKVC (SEC ID N.º 67). Ninguno de los péptidos de control mostró un aumento de MBP en los cocultivos tratados. (Fig. 16).

Estos estudios indican, además, que los péptidos pequeños del dominio Ig de Sp35 pueden actuar como un antagonista de Sp35 para paliar la inhibición de la mielinización por parte de Sp35.

Ejemplo 7

DN-Sp35 actúa en neuronas de GRD y oligodendrocitos para promover la mielinización

Se realizaron experimentos para abordar las contribuciones relativas al proceso de mielinización de Sp35 en las neuronas de GRD en comparación con los oligodendrocitos. Se infectaron neuronas de GRD, oligodendrocitos y cocultivos (preparados según lo descrito en el Ejemplo 5) con los vectores lentivirales FL-Sp35 y DN-Sp35 descritos en el Ejemplo 1, y se realizó una tinción inmunohistoquímica para las células MBP⁺ mielinizadas tras dos semanas. Se observaron un aumento del doble en los niveles de MBP de los cocultivos en los que ambas células expresaban DN-Sp35 y una disminución del doble en los niveles de MBP de los cocultivos en los que ambas células expresaban FL-Sp35 (Fig. 10G).

La sobreexpresión de FL-Sp35 en cualquiera o ambos tipos de células disminuyó significativamente los niveles basales de mielinización en comparación con el control (vector vacío). Por otra parte, la sobreexpresión de DN-Sp35 en cualquiera o ambos tipos de células aumentó los niveles basales de mielinización de 2 a 3 veces en comparación con el control (Fig. 10G). El Sp35-Fc añadido exógenamente invirtió la inhibición de la mielinización mediante la sobreexpresión de FL-Sp35 en cualquiera o ambos tipos de células. Además, el Sp35-Fc exógeno aumentó aún más la mielinización cuando cualquiera de los tipos de células sobreexpresó DN-Sp35 solo y tuvo efectos leves cuando ambos tipos de células sobreexpresaron DN-Sp35. Estos estudios indican que la expresión de una proteína Sp35 dominante negativa en ambos oligodendrocitos y en neuronas de GRD o el tratamiento con proteína Sp35-Fc contribuye a la mielinización.

Ejemplo 8

Los ratones con Sp35 desactivado presentan una mielinización de aparición temprana

Se generaron ratones con Sp35 desactivado con un vector de reemplazo GFP-Neo (proteína verde fluorescente/neomicina) dirigido a la secuencia codificante de un solo exón completa de Sp35 según lo descrito por Schiemann *et al.*, (*Science* 293: 2111-2114 (2001)). Se aisló ADN 129/SvJ genómico de un banco genómico lambda (Stratagene # 946313). Se subclonó un fragmento EcoRV de 14,6 kb en pBSK⁺ y luego sirvió de diana mediante recombinación homóloga en bacterias para insertar el gen indicador eGFP Q40 en ATG de iniciación. El constructo final eliminó la totalidad de 1-1.841 nucleótidos de la secuencia codificante de un solo exón de Sp35. Este constructo se usó para dirigirse al locus de Sp35 en células madre embrionarias D3 (129/Sv). Las células diana correctas se identificaron mediante transferencia Southern de ADN de células madre embrionarias digeridas por EcoRI y se inyectaron en blastocitos C57B1/6 para generar ratones quiméricos. Se cruzaron las quimeras con ratones C57B1/6 para generar ratones fundadores heterocigóticos. Los genotipos se determinaron mediante PCR de tres cebadores del ADN de la cola. El cebador directo, 5'-CTATCCAAGCACTGCCTGCTC-3' (SEC ID N.º 53) y los dos cebadores inversos, 5'-GAGTTCTAGCTCCTCCAGGTGTG-3' (SEC ID N.º 54) y 5'-3-GATGCCCTTCAGCTCGATGCG-3' (SEC ID N.º 55) generaron productos alélicos de tipo natural de 275 pb y mutantes de 356 pb (94°C durante 20 s; 65°C durante 30 s; 72°C durante 30 s). Véase Mi, S. *et al.*, *Nat. Neurosci.* 7: 221-228 (2004). La validación de la eliminación del gen Sp35 se realizó mediante análisis de transferencia Southern, RT-PCR y transferencia Northern. Se detectaron bandas destacables en la transferencia Northern y la RT-PCR en ratones de tipo natural, pero se observó una ausencia total de las bandas en los ratones con la desactivación. Las transferencias Southern de los

heterocigotos mostraron el alelo Sp35 tanto de tipo natural como el modificado. Los ratones con Sp35 desactivado parecían normales, sin anomalías físicas evidentes ni alteraciones en el comportamiento, la locomoción o la fecundidad. Los compañeros de camada F1 heterocigóticos variaron en cuanto al tamaño.

5 Se evaluaron los posibles cambios en la diferenciación de los oligodendrocitos cultivados de ratones con Sp35 desactivado mediante IHC. Se observaron oligodendrocitos más altamente diferenciados y un mayor porcentaje de oligodendrocitos maduros en el grupo de Sp35 desactivado que en los cultivos de compañeros de camada de tipo natural. Debido a que el inicio de la mielinización en el desarrollo normal del ratón se produce normalmente a los 5 días de nacer, a continuación, se examinó la mielinización en médulas espinales P1 de ratones de tipo natural y de Sp35 desactivado mediante microscopía electrónica. En consonancia con los cultivos *in vitro*, la médula espinal de 10 los ratones de Sp35 desactivado contenía más fibras de axones mielinizadas que sus compañeros de camada de tipo natural. Fig. 11. No hubo cambios evidentes en el nervio ciático del sistema nervioso periférico en los ratones de Sp35 desactivado, lo que sugiere que los efectos de la mielinización se limitaron al SNC.

Los GRD y los oligodendrocitos cocultivados de ratones con desactivación mostraron más interacción de los GRD y los oligodendrocitos y más mielinización. Los GRD y los oligodendrocitos cocultivados de ratones con desactivación 15 de Sp35 muestran una mayor diferenciación de los oligodendrocitos y una mayor mielinización. Cuando se examina el tejido de médula espinal de los ratones con desactivación mediante microscopía electrónica, los ratones con desactivación de Sp35 recién nacidos (día 1 (P1) y día 6 (P6) después de nacer) muestran más fibra de mielinización que sus compañeros de camada de tipo natural.

También se generaron ratones transgénicos que sobre-expresaban Sp35 de tipo natural según el procedimiento de Hogan B., "Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Press (1986), pp 153-183. Cuando se examinaron ratones transgénicos que sobre-expresaban Sp35 mediante microscopía electrónica, los ratones recién nacidos (día 8 después de nacer (P8)) mostraron menos fibra de mielinización que sus compañeros 20 de camada de tipo natural.

Ejemplo 9

25 Sp35-Fc potencia la supervivencia de los oligodendrocitos y la mielinización *in vivo*

Se suministró cuprizona (molida al 0,2% con comida molida para ratones en peso) durante 6 semanas a ratones macho C57B1/6 de tipo natural adultos para provocar la desmielinización en el cuerpo calloso. Se inyectó Sp35-Fc estereotácticamente en el cuerpo calloso desmielinizante a las 2, 2,5 y 3 semanas del suministro de la cuprizona. A los ratones control, se administraron estereotácticamente inyecciones en los mismos intervalos con medios esterilizados que no contenían Sp35-Fc. Tras 6 semanas del suministro de la cuprizona, se volvió a administrar una dieta normal a los ratones durante 2, 4 y 6 semanas (sólo comida molida para ratones) para permitir la remielinización. 30

Se anestesiaron los ratones tratados con cuprizona con quetamina (80 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal) y se situaron en un aparato de inmovilización diseñado para la cirugía estereotáctica (David Kopf Instruments). Se abrió el cuero cabelludo y se inyectaron los compuestos estériles (1µM en 1 ml de HBSS) unilateralmente en el cuerpo calloso desmielinizado de forma aguda de los ratones receptores de tipo natural con una jeringa Hamilton de 10 ml usando coordenadas estereotácticas de 0,7 mm posterior y 0,3 mm lateral al bregma a una profundidad de 1,7 mm (Messier *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63(2): 313-18 (1999)). Además, los ratones receptores control recibieron una inyección estereotácticamente con HBSS que no contenía los compuestos. 35 Se llenó la abertura del cuero cabelludo con Gelfoam, se aplicaron penicilina y estreptomina en la zona (Gibco) y se cosió la herida con hilo de sutura. Tras la inyección, los ratones se sacrificaron cada semana del experimento y se extirparon los cerebros, que se procesaron para su análisis molecular, bioquímico e histológico. 40

Los animales que recibieron el tratamiento con Sp35-Fc mostraron una mayor supervivencia de los oligodendrocitos maduros (en base a una tinción con anticuerpo contra CC1, Fig. 12) y mielinización axonal mediante IHC usando anticuerpo contra la proteína MBP o azul rápido de luxol (no se muestran los datos). 45

Ejemplo 10

Transplante *in vivo* de células transformadas con Sp35

También se investigó la función biológica de Sp35 en la lesión de la médula espinal. Se infectaron células corticales primarias cultivadas (cultivos mixtos) con retrovirus que expresaba Sp35 o un control de retrovirus para la administración en el epicentro lesionado de las médulas espinales de ratas. Se introducen 2×10^6 células, y se sacrifican las ratas al décimo día. Se fijan las médulas espinales en paraformaldehído al 4% durante una noche, luego se deshidratan en etanol al 70% seguido de etanol al 95%. Las muestras de tejido se introducen en parafina. Se usan secciones (10 micrómetros de espesor) para la tinción inmunohistoquímica. Se controla la supervivencia de los oligodendrocitos y la mielinización axonal en las ratas lesionadas que reciben Sp35. Se observan más oligodendrocitos y mielinización axonal, y menos retracción axonal en los animales que reciben células que expresan a Sp35. 50 55

El constructo retroviral de Sp35 para estos experimentos se prepara de la siguiente manera. Se amplificó el gen Sp35 mediante PCR usando los cebadores 5-GATTACTCGAGATGCTGCGGGGGCGTGAGG-3' (SEC ID N.º 56), que contiene un sitio *XhoI*, y 5'-CGCGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (SEC ID N.º 57), que contiene un sitio *EcoRI*. Se digirió el producto PCR con *XhoI* y *EcoRI*, luego se ligó al vector retroviral pMIG (que contiene IRES-GFP), que se había escindido previamente con *XhoI* y *EcoRI*. El nuevo vector se designó pMMC078. Todos los aislados de pMMC078 contenían mutaciones puntuales involuntarias, por lo que se ligaron dos aislados de pMMC078 entre sí. pMMC078.6 se cortó con *XhoI* y *AccI*, y pMMC078.7 se cortó con *XhoI* y *AccI*. Se ligaron estos dos fragmentos entre sí para crear el plásmido correcto final, pMMC089. La secuencia de ADN del inserto se confirmó mediante secuenciación de ADN. El retrovirus Sp35 se creó según lo descrito. Se separaron células 293G el día anterior a la transfección. Se usaron 8 µg de ADN de retrovirus Sp35 para transfectar 5×10^6 células mediante lipofectamine (Invitrogen). Se cosechó el medio de acondicionamiento 92 horas después de la transfección. Se centrifugó el medio acondicionado a 5.000g durante 10 minutos y se usó el sobrenadante como cultivo patrón de retrovirus Sp35. Se almacenó este cultivo patrón a 4°C durante 1 semana o a -80°C durante 6 meses.

Ejemplo 11

15 Sp35-Fc potencia la supervivencia neuronal y de los oligodendrocitos tras una lesión de la médula espinal (LME) *in vivo*

Se produjeron lesiones en la médula espinal de ratas Long Evans hembra adultas (190-210 g, Charles River). Se realizó una hemisección dorsal en T6/T7, interrumpiendo completamente los componentes del tracto corticoespinal (TCE) dorsolateral menor y dorsomedial superior. Se transectó la médula esteróticamente a una profundidad de 1,8 mm de la superficie usando un microescapelo. Inmediatamente después de la transección del TCE, se insertó un catéter intratecal en el espacio subaracnoideo en T7 y se conectó a una bomba miniosmótica cebada (modelo Alzet 2004, Alza Corp.) insertada en el espacio subcutáneo. Las bombas miniosmóticas administraron 0,25 µl/h de proteína de fusión Sp35-Fc 25µM o cualquier IgG humana (5 mg/ml) o PBS como control. Los cuidados postoperatorios comprendieron analgesia (Buprenorfina/Buprenex, Reckitt Benckiset Healthcare Ltd., 0,05 mg/kg subcutáneamente) cada 8-12 horas durante 3 días y un tratamiento antibiótico (ampicilina, Bristol Myers Squibb, 100 mg/kg subcutáneamente dos veces al día) durante 7 días después de la cirugía. Se expresaron cámaras de aire manualmente dos veces al día mientras duró el estudio (4 semanas) o hasta el retorno de la función. Al finalizar el estudio, se anestesiaron las ratas y se aplicó solución salina heparinizada por perfusión transcárdialmente seguida de paraformaldehído al 4% (PFA). Se extirparon las médulas espinales, se introdujeron en parafina y se cortaron secciones de 10 µm para el análisis histológico.

Para cuantificar la muerte celular apoptótica tras una LME, se practicó la eutanasia a los animales 3 ó 7 días después de la LME y se tiñeron con anticuerpo contra la caspasa 3 activada (Cell Signaling Technologies) y con TUNEL (Promega). También se tiñeron las secciones con anticuerpo anti-NeuN (Chemicon) y anticuerpo anti-CC1 (Calbiochem) para identificar las neuronas y los oligodendrocitos, respectivamente.

35 Se observó una extensiva tinción con TUNEL tanto rostral como caudal al sitio de la transección 3 días después de la LME y una tinción con caspasa 3 activada se colocó tanto con neuronas como con oligodendrocitos. El número de neuronas y oligodendrocitos positivos en caspasa 3 activada fue significativamente menor en los animales tratados con Sp35-Fc que en los controles 3 días después de la LME. Además, cuatro semanas después de la LME, más neuronas y oligodendrocitos sobrevivieron en el tejido de médula espinal que rodeaba la zona de la lesión en los animales tratados con Sp35-Fc que en los controles en base a la tinción con anticuerpo anti-tubulina βIII (supervivencia neuronal) y anticuerpo anti-O4 (supervivencia de los oligodendrocitos).

Ejemplo 12

Sp35-Fc reduce la activación de la caspasa 3 y la muerte celular *in vitro*

45 Se diferenciaron células PC12 (Neuro screen) en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 5%, suero de caballo al 10%, glutamina 2mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina que contenía 200 ng/ml de NGF durante 7 días. Para los experimentos, se reemplazaron los medios de cultivo por medios de cultivo libres de NGF que contenían Sp35-Fc, IgG humana como control negativo (0,1-10µM) o zVAD como control positivo (0,1µM). 18 horas después de la retirada de NGF, se cuantificó la caspasa 3 activada usando el kit Caspasa 3/7 Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. 42 horas después de la retirada de NGF, se cuantificó la muerte celular apoptótica usando un kit ELISA de detección de muerte celular (Roche) según las instrucciones del fabricante.

55 Se observó que Sp35-Fc 0,1µM redujo la activación de la caspasa 3 en las células PC12 diferenciadas privadas de soporte trófico 18 horas después de retirar el NGF de los medios de cultivo. El efecto de Sp35-Fc sobre la activación de la caspasa 3 dependió de la dosis, siendo a mayores dosis (1 ó 10µM) tan eficaz como a una dosis neuroprotectora de inhibidor de la caspasa zVAD (0,1µM) (Fig. 14). Como otra medida de la muerte celular, se cuantificó la apoptosis usando un procedimiento de ELISA con TUNEL, y se descubrió que Sp35-Fc redujo significativamente la muerte celular medida 42 horas después de retirar el NGF (Fig. 13).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen Idec
 Mi, Sha
 Pepinsky, R. Blake
 5 McCoy, John
 <120> Tratamiento de afecciones que implican desmielinización
 <130> 2159.046PC05
 <140> Pendiente de asignación
 <141> Adjunto
 10 <150> 60/680,475
 <151> 13-05-2005
 <150> 60/628,435
 <151> 15-11-2004
 <150> 60/617,297
 15 <151> 07-10-2004
 <150> 60/582,966
 <151> 24-06-2004
 <160> 79
 <170> PatentIn versión 3.2
 20 <210> 1
 <211> 1845
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

```

atgctggcgg gggggcgg gagcatgcc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc 60
ctcctgctgg tgctgggctc agtgctgtca ggctcggcca cgggctgccc gccccgctgc 120
gagtgctccg cccaggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt ggcagtcccc 180
gagggcatcc ccaccgagac ggcctgctg gacctaggca agaaccgcat caaaacgctc 240
aaccaggacg agttcgccag ctccccgac ctggaggagc tggagctcaa cgagaacatc 300
gtgagcgccg tggagcccgg cgccttcaac aacctcttca acctccggac gctgggtctc 360
cgcagcaacc gcctgaaget catccccgta ggcgtcttca ctggcctcag caacctgacc 420
aagctggaca tcagcgagaa caagattggt atcctgctgg actacatggt tcaggacctg 480
tacaacctca agtcactgga ggttggcgac aatgacctcg tctacatctc tcacogcgcc 540
ttcagcggcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct gacctccatc 600
cccaccgagg cgctgtccca cctgcacggc ctcatcgtcc tgaggetccg gcacctcaac 660
atcaatgcca tccgggacta ctccttcaag aggctctacc gactcaaggt cttggagatc 720
tcccactggc cctacttggg caccatgaca cccaactgcc tctacggcct caacctgacg 780
    
```

```

tccctgtcca tcacacactg caatctgacc getgtgecct acctggccgt ccgccaccta      840
gtctatctcc gcttccctcaa cctctcctac aaccccatca gcaccattga gggctccatg      900
ttgcatgagc tgctccggct gcaggagatc cagctgggtg gggggcagct ggcctggtg      960
gagccctatg ccttccgagg cctcaactac ctgcgcgtgc tcaatgtctc tggcaaccag     1020
ctgaccacac tggaggaatc agtcttccac tcggtgggca acctggagac actcatctg      1080
gactccaacc cgtggcctg cgactgtcgg ctctgtggg tgttcggcg ccgctggcgg      1140
ctcaacttca accggcagca gccacgtgc gccacgccc agtttgteca gggcaaggag      1200
ttcaaggact tccctgatgt gctactgcc aactacttca cctgcccgg ccgccgcatc      1260
cgggaccgca aggcccagca ggtgtttgtg gacgagggc acacgggtgca gtttgtgtgc      1320
cgggccgatg ggcaccgcc gccgcctc ctctggctct caccocgaaa gcacctggtc      1380
tcagccaaga gcaatggggc gctcacagtc ttccctgatg gcaagctgga ggtgcgctac      1440
gcccaggtac aggacaacgg caegtacctg tgcctgcgg ccaacgccc cggcaaccgac      1500
tccatgcccg cccacctgca tgtgcgcage tactogccc actggcccca tcagcccaac      1560
aagaccttgc ctttcatctc caaccagccg ggcgagggag aggccaacag caccgcgcc      1620
actgtgcctt tccccttoga catcaagacc ctcatcatcg ccaccaccat gggcttcatc      1680
tctttcctgg ggtcgtcct cttctgcctg gtgctgctgt ttctctggag cgggggcaag      1740
ggcaacacaa agcacaacat cgagatcgag tatgtgcccc gaaagtcgga cgcaggcatc      1800
agctccgcg acgcccgcg caagttcaac atgaagatga tatga                          1845

```

<210> 2
 <211> 614
 <212 > PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

```

Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1           5           10          15

```

```

Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
          20           25           30

```

```

Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
          35           40           45

```

```

Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
          50           55           60

```

Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
 65 70 75 80

Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
 85 90 95

Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
 100 105 110

Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
 115 120 125

Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
 130 135 140

Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
 165 170 175

Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
 180 185 190

Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
 195 200 205

His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
 210 215 220

Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
 225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255

Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
 260 265 270

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 275 280 285

Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
 290 295 300

Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
 565 570 575

Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
 580 585 590

Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
 595 600 605

Phe Asn Met Lys Met Ile
 610

<210> 3

<211> 1845

<212> ADN

5 <213> *Mus sp.*

<400> 3

atgctggcag ggggtatgag aagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccata 60
 ctctgctggt tactgggctc agtgetgtca ggetctgcta caggctgccc gcccogctgc 120
 gagtgetcag cgcaggaccg agcogtgetc tgccaccgca aacgctttgt ggcggtgccc 180
 gagggcatcc ccaccgagac tcgctgctg gacctgggca aaaaccgcat caagacactc 240
 aaccaggacg agtttgccag ctccccacac ctggaggagc tagaactcaa tgaaaacatc 300
 gtgagcgccg tggagccagg cgcttcaac aacctctca acctgaggac tctggggctg 360
 cgcagcaacc gcctgaagct taccocgctg ggcgtctca ccggcctcag caacttgacc 420
 aagctggaca tcagtgagaa caagatcgtc atctgctag actacatggt ccaagaccta 480
 tacaacctca agtcgctgga ggtcggogac aacgaccteg tctacatctc ccatcgagcc 540
 ttcagcggcc tcaacagcct ggaacagctg acgctggaga aatgcaatct gacctccatc 600
 cccacggagg cgctctcca cctgcacggc ctcatcgtcc tgcggctacg acatctcaac 660
 atcaatgcca tcagggacta ctcttcaag aggctgtacc gacttaaggt cttagagatc 720
 tcccactggc cctacctgga caccatgacc cccaactgcc tctacggcct caacctgaca 780
 tccctateca tcacgcactg caacctgaca gccgtgccct atctggcagt gcgtcacctg 840
 gtctatctcc gtttctcaa cctttctac aacccaatcg gtacaatcga gggctccatg 900
 ctgcatgagc tgctgcggtt gcaggagatc cagctggtag gcgggcagct ggcogtgggt 960
 gagccctatg cctttcgtgg gctcaactac ctgogtgtgc tcaatgtctc tggcaaccag 1020
 ctgaccaccc tggaggagtc agccttccat tcggtgggca acctggagac gctcatcctg 1080
 gactccaacc cactggcctg tgactgccgg ctgctgtggg tgttcggcg cgcgtggcgg 1140

ctcaacttca acaggcagca gccacactgc gccacacctg agttcgtcca gggcaaagag 1200
 ttcaaggact ttccggatgt actcctaccc aactacttca cctgccgccg ggccccacatc 1260
 cgggacogca aggcacagca ggtgtttgta gatgagggcc acacggtgca gtttgtatgc 1320
 cgggcagatg gcgaccctcc accagctatc ctttggetct caccocgcaa gcacttggtc 1380
 toggccaaga gcaatggggc gctcacagtc ttccctgatg gcaogctgga ggtgogctac 1440
 gccacaggtac aggacaacgg cacgtacctg tgcotgcag ccaatgctgg cggcaacgac 1500
 tccatgcccg cccacttgca tgtgogcagc tactegcctg actggcccca tcaacccaac 1560
 aagaccttcg ccttcatctc caaccagcca ggcgagggag aggccaacag caccogcgcc 1620
 actgtgcctt tcccttoga catcaagacg ctcattatcg ccaccaccat gggettcac 1680
 tccttctgg gcgttgtcct attctgcctg gtgctgctgt ttctatggag cgggggcaaa 1740
 ggcaacacaa agcacaacat cgaaattgag tatgtgcccc ggaaatcoga cgcaggcatc 1800
 agctcagctg atgcaccccg caagttcaac atgaagatga tatga 1845

- <210> 4
- <211> 614
- <212> PRT
- 5 <213> *Mus* sp.
- <400> 4

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

Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
 115 120 125

Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
 130 135 140

Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
 165 170 175

Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
 180 185 190

Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
 195 200 205

His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
 210 215 220

Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
 225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255

Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
 260 265 270

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 275 280 285

Ser Tyr Asn Pro Ile Gly Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
 290 295 300

Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val
 305 310 315 320

Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val
 325 330 335

Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe His Ser Val
 340 345 350

Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp

Phe Asn Met Lys Met Ile

610

<210> 5

<211> 6

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Gln Val Ser Lys Arg

1

5

10 <210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 6

Ile Thr Xaa Xaa Xaa

20

1

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 7

30 **Ala Cys Xaa Xaa Xaa**

1

5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 8

Val Cys Xaa Xaa Xaa

5 **1** **5**

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<2.22 > (3)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 9

15 **Ser Pro Xaa Xaa Xaa**

1 **5**

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Ser Pro Arg Lys His

1 **5**

<210> 11

25 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ser Pro Arg Lys Lys

30 **1** **5**

<210 > 12

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 12

Ser Pro Arg Lys Arg

1 **5**

	<210>	13
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	<i>Homo sapiens</i>
5	<400>	13
	Ser Pro Lys Lys His	
	1	5
	<210>	14
	<211>	5
10	<212>	PRT
	<213>	<i>Homo sapiens</i>
	<400>	14
	Ser Pro His Lys His	
	1	5
15	<210>	15
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	<i>Homo sapiens</i>
	<400>	15
20	Ser Pro Arg Arg His	
	1	5
	<210>	16
	<211>	5
	<212>	PRT
25	<213>	<i>Homo sapiens</i>
	<400>	16
	Ser Pro Arg His His	
	1	5
	<210>	17
30	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	<i>Homo sapiens</i>
	<400>	17
	Ser Pro Arg Arg Arg	
35	1	5
	<210>	18
	<211>	5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Ser Pro His His His

5 **1** **5**

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 19

Ser Pro Lys Lys Lys

1 **5**

<210> 20

<211> 6

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ile Thr Pro Lys Arg Arg

1 **5**

20 <210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

25 **Ala Cys His His Lys**

1 **5**

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

Val Cys His His Lys

1 **5**

<210> 23

35 <211> 5

<212> PRT

<213 > *Homo sapiens*

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 <223 > Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 5 <400> 23
Xaa Xaa Arg Lys His
1 5
 <210> 24
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 24
Xaa Xaa Arg Arg Arg
1 5
 <210> 25
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 25 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 25
Xaa Xaa Lys Lys Lys
1 5
 30 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 26

Xaa Xaa His His His

1 5

<210> 27

5 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (1) .. (2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural acid

<400> 27

Xaa Xaa Arg Lys Lys

1 5

15 <210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213 > *Homo sapiens*

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural acid

<400> 28

Xaa Xaa Arg Lys Arg

25 **1 5**

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural acid

<400> 29

35 **Xaa Xaa Lys Lys His**

1 5

<210> 30

<211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural acid
 <400> 30
Xaa Xaa His Lys His
 10 **1 5**
 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 31
 20 **Xaa Xaa Arg Arg His**
1 5
 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(2)
 <223 > Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 30 <400> 32
Xaa Xaa Arg His His
1 5
 <210> 33
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 34

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg

1 5

10 <210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

15 **Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys**

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 37

25 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys

30 **1 5**

<210> 38

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador directo de RT-PCR de rata

<400> 38

	agagacatgc gattggtga	19
	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de RT-PCR de rata	
	<400> 39	
	agagatgtag acgaggtcat t	21
10	<210> 40	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> LV1-035 (oligo sentido)	
	<400> 40	
	tgatcgtcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttccc	55
	<210> 41	
	<211> 59	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LV1-036 (oligo antisentido)	
	<400> 41	
25	tcgagaaaa agatcgtcat cctgctagac tctctgaag tctagcagga tgacgatca	59
	<210> 42	
	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> LV1-035 Control	
	<400> 42	
	tgatcctcat ccttctatac ttcaagagag tgtagcagga tgacgatctt ttttctcga	59
	<210> 43	
35	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	LV1-036 Control	
	<400>	43	
		tcgagaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tatagaagga tgacgatca	59
5	<210>	44	
	<211>	41	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	Cebador de FL-Sp35	
	<400>	44	
		gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactct g	41
	<210>	45	
	<211>	41	
15	<212>	ADN	
	<212>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de FL-Sp35	
	<400>	45	
20		ggggcggaat tggatcctca cagatcctct tctgagatga g	41
	<210>	46	
	<211>	41	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador de DN-Sp35	
	<400>	46	
		gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactct g	41
	<210>	47	
30	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de DN-Sp35	
35	<400>	47	
		gatacggatc ctcagccttt gccccggctc catagaaca gc	42
	<210>	48	

	<211>	37	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
5	<223>	Cebador directo de Sp35 humano	
	<400>	48	
		cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt	37
	<210>	49	
	<211>	59	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso de Sp35 humano	
	<400>	49	
15		cagcaggtcg acctcgcccg gctggttggc caaccagccg ggcgaggtcg acctcgagg	59
	<210>	50	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Cebador directo de Sp35	
	<400>	50	
		ctttcccctt cgacatcaag ac	22
	<210>	51	
25	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso de Sp35	
30	<400>	51	
		cagcagcacc aggcagaa	18
	<210>	52	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
35	<213 >	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Sonda marcada con FAM	

	<400>	52	
		atgccacca ccatgggctt cat	23
	<210>	53	
	<211>	21	
5	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador directo murino	
	<400>	53	
10		ctatccaagc actgcctgct c	21
	<210>	54	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Cebador inverso murino	
	<400>	54	
		gagttctagc tcctccagggt gtg	23
	<210>	55	
20	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso murino	
25	<400>	55	
		gatgcccttc agctcgatgc g	21
	<210>	56	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
30	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de Sp35	
	<400>	56	
		gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg	32
35	<210>	57	
	<211>	36	
	<212>	ADN	

<400> 62

Leu Ser Pro Glu Lys Val

1 5

<210> 63

5 <211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (1) . . (1)

<223> La posición 1 es Gly biotinilada

<400> 63

Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys

1 5 10

15 <210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213 > *Homo sapiens*

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)

<223> La posición 1 es Gly biotinilada

<400> 64

Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys

25 **1 5 10**

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)

<223> La posición 1 es Gly biotinilada

<400> 65

35 **Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys**

1 5 10

<210> 66

<211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> La posición 1 es Cys biotinilada
 <400> 66
Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys
 10 **1 5**
 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> La posición 1 es Cys biotinilada
 <400> 67
 20 **Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys**
1 5
 <210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido básico
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 68

Ile Thr Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 69

5 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

15 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

20 <400> 69

Ala Cys Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 70

<211> 5

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

30 <223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

35 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 70

Val Cys Xaa Xaa Xaa

1 5

5 <210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

20 <223> Xaa es cualquier aminoácido básico

<400> 71

Ser Pro Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 72

25 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Ser Pro Arg leu His

30 **1 5**

<210> 73

<211> 200

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Estructura general para un oligonucleótido usado en la preparación de una molécula de ARNip

<220>

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 75

Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys

1 5 10

<210> 76

<211> 11

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys

1 5 10

15 <210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

20 **Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys**

1 5 10

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys

1 5

<210> 79

30 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys

35 **1 5**

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para potenciar la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos, procedimiento que comprende poner en contacto oligodendrocitos que expresan a Sp35 con una cantidad eficaz de una composición que comprende un antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 (i) un polipéptido Sp35 soluble que carece de un dominio transmembrana de Sp35 y un dominio citoplasmático de Sp35;
- (ii) un anticuerpo de Sp35 o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- (iii) un polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido antisentido; (b) una ribozima; (c) un ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (d) un ARN en horquilla pequeño (ARNhp); y
- 10 (iv) una combinación de dos o más de dichos antagonistas de Sp35.
2. Un antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido Sp35 soluble que carece de un dominio transmembrana de Sp35 y un dominio citoplasmático de Sp35;
- 15 (ii) un anticuerpo de Sp35 o un fragmento de unión al antígeno del mismo;
- (iii) un polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido antisentido; (b) una ribozima; (c) un ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (d) un ARN en horquilla pequeño (ARNhp); y
- (iv) una combinación de dos o más de dichos antagonistas de Sp35;
- 20 para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la esclerosis múltiple en un mamífero mediante la potenciación de la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos que expresan a Sp35.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o el antagonista para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho antagonista de Sp35 comprende un polipéptido Sp35 soluble.
4. El procedimiento de la reivindicación 3 o el antagonista para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende:
- 25 (i) un dominio Ig de Sp35;
- (ii) un dominio LRR de Sp35; y
- (iii) una región básica de Sp35 C-terminal al dominio LRR.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o el antagonista para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende un dominio LRR de Sp35 y carece de:
- 30 (i) un dominio Ig de Sp35; y
- (ii) una región básica de Sp35 C-terminal al dominio LRR.
6. El procedimiento de la reivindicación 3 o el antagonista para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble carece de un dominio Ig de Sp35 y un dominio LRR de Sp35.
- 35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende un fragmento polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) los aminoácidos 1 a 33 de SEC ID N.º 2;
- (ii) los aminoácidos 1 a 35 de SEC ID N.º 2;
- 40 (iii) los aminoácidos 34 a 64 de SEC ID N.º 2;
- (iv) los aminoácidos 36 a 64 de SEC ID N.º 2;
- (v) los aminoácidos 66 a 89 de SEC ID N.º 2;
- (vi) los aminoácidos 90 a 113 de SEC ID N.º 2;

- (vii) los aminoácidos 114 a 137 de SEC ID N.º 2;
 - (viii) los aminoácidos 138 a 161 de SEC ID N.º 2;
 - (ix) los aminoácidos 162 a 185 de SEC ID N.º 2;
 - (x) los aminoácidos 186 a 209 de SEC ID N.º 2;
 - 5 (xi) los aminoácidos 210 a 233 de SEC ID N.º 2;
 - (xii) los aminoácidos 234 a 257 de SEC ID N.º 2;
 - (xiii) los aminoácidos 258 a 281 de SEC ID N.º 2;
 - (xiv) los aminoácidos 282 a 305 de SEC ID N.º 2;
 - (xv) los aminoácidos 306 a 329 de SEC ID N.º 2;
 - 10 (xvi) los aminoácidos 330 a 353 de SEC ID N.º 2;
 - (xvii) los aminoácidos 363 a 416 de SEC ID N.º 2;
 - (xviii) los aminoácidos 417 a 424 de SEC ID N.º 2;
 - (xix) los aminoácidos 419 a 493 de SEC ID N.º 2;
 - (xx) los aminoácidos 494 a 551 de SEC ID N.º 2.
- 15 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende un fragmento polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) los aminoácidos 1 a 64 de SEC ID N.º 2;
 - (ii) los aminoácidos 1 a 89 de SEC ID N.º 2;
 - 20 (iii) los aminoácidos 1 a 113 de SEC ID N.º 2;
 - (iv) los aminoácidos 1 a 137 de SEC ID N.º 2;
 - (v) los aminoácidos 1 a 161 de SEC ID N.º 2;
 - (vi) los aminoácidos 1 a 185 de SEC ID N.º 2;
 - (vii) los aminoácidos 1 a 209 de SEC ID N.º 2;
 - 25 (viii) los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID N.º 2;
 - (ix) los aminoácidos 1 a 257 de SEC ID N.º 2;
 - (x) los aminoácidos 1 a 281 de SEC ID N.º 2;
 - (xi) los aminoácidos 1 a 305 de SEC ID N.º 2;
 - (xii) los aminoácidos 1 a 329 de SEC ID N.º 2;
 - 30 (xiii) los aminoácidos 1 a 353 de SEC ID N.º 2;
 - (xiv) los aminoácidos 1 a 416 de SEC ID N.º 2;
 - (xv) los aminoácidos 1 a 424 de SEC ID N.º 2;
 - (xvi) los aminoácidos 1 a 493 de SEC ID N.º 2;
 - (xvii) los aminoácidos 1 a 551 de SEC ID N.º 2;
 - 35 (xviii) los aminoácidos 1 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (ixx) los aminoácidos 1 a 532 de SEC ID N.º 2.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende un fragmento

polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) los aminoácidos 34 a 89 de SEC ID N.º 2;
- (ii) los aminoácidos 34 a 113 de SEC ID N.º 2;
- (iii) los aminoácidos 34 a 137 de SEC ID N.º 2;
- 5 (iv) los aminoácidos 34 a 161 de SEC ID N.º 2;
- (v) los aminoácidos 34 a 185 de SEC ID N.º 2;
- (vi) los aminoácidos 34 a 209 de SEC ID N.º 2;
- (vii) los aminoácidos 34 a 233 de SEC ID N.º 2;
- (viii) los aminoácidos 34 a 257 de SEC ID N.º 2;
- 10 (ix) los aminoácidos 34 a 281 de SEC ID N.º 2;
- (x) los aminoácidos 34 a 305 de SEC ID N.º 2;
- (xi) los aminoácidos 34 a 329 de SEC ID N.º 2;
- (xii) los aminoácidos 34 a 353 de SEC ID N.º 2;
- (xiii) los aminoácidos 34 a 416 de SEC ID N.º 2;
- 15 (xiv) los aminoácidos 34 a 424 de SEC ID N.º 2;
- (xv) los aminoácidos 34 a 493 de SEC ID N.º 2;
- (xvi) los aminoácidos 34 a 551 de SEC ID N.º 2.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende un fragmento polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) los aminoácidos 34 a 530 de SEC ID N.º 2;
- (ii) los aminoácidos 34 a 531 de SEC ID N.º 2;
- (iii) los aminoácidos 34 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (iv) los aminoácidos 34 a 533 de SEC ID N.º 2;
- 25 (v) los aminoácidos 34 a 534 de SEC ID N.º 2;
- (vi) los aminoácidos 34 a 535 de SEC ID N.º 2;
- (vii) los aminoácidos 34 a 536 de SEC ID N.º 2;
- (viii) los aminoácidos 34 a 537 de SEC ID N.º 2;
- (ix) los aminoácidos 34 a 538 de SEC ID N.º 2;
- 30 (x) los aminoácidos 34 a 539 de SEC ID N.º 2;
- (xi) los aminoácidos 30 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (xii) los aminoácidos 31 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (xiii) los aminoácidos 32 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (xiv) los aminoácidos 33 a 532 de SEC ID N.º 2;
- 35 (xv) los aminoácidos 34 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (xvi) los aminoácidos 35 a 532 de SEC ID N.º 2;
- (xvii) los aminoácidos 36 a 532 de SEC ID N.º 2;

- (xviii) los aminoácidos 30 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (xix) los aminoácidos 31 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (xx) los aminoácidos 32 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (xxi) los aminoácidos 33 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - 5 (xxii) los aminoácidos 34 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (xxiii) los aminoácidos 35 a 531 de SEC ID N.º 2;
 - (xxiv) los aminoácidos 36 a 531 de SEC ID N.º 2.
11. El procedimiento de la reivindicación 10 o el antagonista para su uso según la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende los residuos de aminoácido 34-532 de SEC ID N.º 2.
- 10 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble comprende además un polipéptido heterólogo.
13. El procedimiento de la reivindicación 12 o el antagonista para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho polipéptido heterólogo está fusionado a dicho polipéptido Sp35 soluble.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 13, o el antagonista para su uso según la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de anticuerpo Ig, un polipéptido de albúmina sérica, un polipéptido de direccionamiento, un polipéptido indicador y un polipéptido facilitador de la purificación.
- 20 15. El procedimiento de la reivindicación 14, o el antagonista para su uso según la reivindicación 14, en el que dicho polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste en una bisagra y Fc de una inmunoglobulina, albúmina de suero humano y un marcador de histidina.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble está conjugado con un polímero.
- 25 17. El procedimiento de la reivindicación 16, o el antagonista para su uso según la reivindicación 16, en el polímero se selecciona del grupo que consiste en un polialquilenglicol, un polímero de azúcar y un polipéptido.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, o el antagonista para su uso según la reivindicación 17, en el polímero es un polialquilenglicol.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, o el antagonista para su uso según la reivindicación 18, en el polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG).
- 30 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, o el antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicho polipéptido Sp35 soluble está conjugado con 1, 2, 3 ó 4 polímeros.
21. El procedimiento de la reivindicación 20, o el antagonista para su uso según la reivindicación 20, en el que el peso molecular de los polímeros es de 5.000 Da a 100.000 Da.
- 35 22. El procedimiento de la reivindicación 1 o el antagonista para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho antagonista de Sp35 comprende un anticuerpo de Sp35 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 40 23. El procedimiento de la reivindicación 1, o el antagonista para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho antagonista de Sp35 comprende un polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido antisentido; (b) una robosima; (c) un ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (d) un ARN en horquilla pequeño (ARNhp).
24. El procedimiento de la reivindicación 23, o el antagonista para su uso según la reivindicación 23, en el que dicho polinucleótido antagonista de Sp35 es un ARNhp.
- 45 25. El procedimiento de la reivindicación 24, o el antagonista para su uso según la reivindicación 24, en el que dicho ARNhp comprende la secuencia de nucleótidos: TGATCGTCAT CCTGCTAGAC TTCAAGAGAG TCTAGCAGGA TGACGATCTT TTTTC (SEC ID N.º 40).
26. El antagonista para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha esclerosis múltiple es una esclerosis múltiple (EM) de recaídas y remisiones.

27. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 26, en el que dicho antagonista de Sp35 es para administrarlo mediante inyección en bolo o infusión crónica.
- 5 28. El antagonista para su uso según la reivindicación 27, en el que dicho antagonista de Sp35 es para su administración directamente en el sistema nervioso central.
29. El antagonista para su uso según la reivindicación 28, en el que dicho antagonista de Sp35 es para su administración directamente en una lesión crónica de EM.
- 10 30. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende: (a) transfectar dichos oligodendrocitos con un polinucleótido que codifique dicho antagonista de Sp35 mediante la unión de forma funcional con una secuencia de control de la expresión; y (b) permitir la expresión de dicho antagonista de Sp35.
31. El antagonista para su uso según la reivindicación 2, en el que el antagonista es codificado por un polinucleótido ligado de forma funcional a una secuencia de control de la expresión.
32. El antagonista para su uso según la reivindicación 31, en el que dicho polinucleótido es un vector de expresión.
33. El antagonista para su uso según la reivindicación 32, en el que dicho vector de expresión es un vector viral.
- 15 34. El antagonista para su uso según la reivindicación 32 ó 33, en el que dicho vector de expresión está en una célula huésped.
35. El antagonista para su uso según la reivindicación 34, en el que dicha célula huésped se va a introducir en o cerca de la zona afectada por la esclerosis múltiple.
- 20 36. El antagonista para su uso según la reivindicación 34 ó 35, en el que dicha célula huésped se prepara mediante un procedimiento que comprende: (a) transformar o transfectar una célula huésped receptora con el polinucleótido citado en la reivindicación 30 o con el vector de la reivindicación 32 ó 33; y (b) cultivar dicha célula huésped transformada o transfectada.
37. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en el que dicha célula huésped se obtiene de un mamífero que se vaya a tratar.
- 25 38. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 37, en el que dicho antagonista de Sp35 está en una cantidad suficiente para reducir la inhibición de la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos en o cerca de la zona afectada por la esclerosis múltiple.
- 30 39. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 38, en el que dicho antagonista de Sp35 está en una cantidad suficiente para reducir la inhibición de mielinización mediada por oligodendrocitos en o cerca de la zona afectada por la esclerosis múltiple.
40. El antagonista para su uso según la reivindicación 33, en el que el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector adenoviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral, un vector papovaviral, un virus del herpes simple y un vector del virus de Epstein Barr.
- 35 41. El antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 32, 33 ó 40, en el que dicho vector es para administrarlo por una vía seleccionada del grupo que consiste en la administración tópica, administración parenteral, administración intratecal y administración subcutánea.

FIG. 1a

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGGCGGCCCGA
GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAG
CCCCCTCTGGCCTGCTGGCAGCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC
TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCAGGA
CCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCGAGGGCATC
CCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCA
ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA
GAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTC
CGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCT
TCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT
TATCCTACTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG
TTGGGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGGGCCTCAAC
AGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCG
AGGCGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCTGAGGCTCCGGCACCTCAA
CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT
TGGAGATCTCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACCTGCCTCTAC
GGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC
CTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCCTACA
ACCCATCAGCACCATTTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCA
GGAGATCCAGCTGGTGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTC
CGCGGCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCA
CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCT
GGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCC
GCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCAGT
TGTCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCAACTACT
TCACCTGCCCGCGCCGCATCCGGACCGCAAGGCCAGCAGTGTGTTGT
GGACGAGGGCCACACGCTGCAGTTTGTGTGCCGGCCGATGGCGACCCGCG
CCCGCATCCTCTGGCTCTACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA
ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCA
GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACCGGGGCGGCAA
CGACTCCATGCCCGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCGACTGGCCCC
ATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGA
GGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCTTCGACATCAAGAACCCTCA
TCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTTCCTGGGCGTCGTCTCTCTGCC
TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAAT
CGAGATCGAGTATGTGCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGAC
GCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGGAG
GGACCCCCGGGCGGCCGGCAGGGGAAGGGCCTGGCCGCCACCTGCTCACT
CTCCAGTCTTCCCACCTCCTCCCTACCTTCTACACAGTCTCTTTCTCCT
CCCGCCTCCGTCCCCTGCTGCCCCCGCCAGCCCTCACCACTGCCCTCCTTC
TACCAGGACCTCAGAAGCCAGACCTGGGGACCCACCTACACAGGGGCATT
GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACACGCGGCAGAGTCAATAAT
TCAATAAAAAAGTTACGAACCTTCTCTGTAACCTGGGTTTCAATAATTATGGA
TTTTTATGAAAACCTTGAATAATAAAAAAGAGAAAAAACTATTTCCCTATAGC
TAGTCGGAATGCAAACCTTTGACGTCCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCAAC
TCAGTTTCTTGTTTTCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCCCCAGTGGGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC
CCACCCACCTGCCACCCCGCCCGCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC
AGGCTGGGCCAGCTCCGGGCTGGCTTTTTGCAGGGCGCAGGTGGAGGGGAC

AGGTCTGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC
ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG
CTGGGGTCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG
AGGTGGGGCCCACCCCAGCCTCTGGTCCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT
GGCCCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCCTCAGTCTCCACATCTGTAC
AAATGGGAACATTACCCCTGCCCTGCCTACCTNANAGGGCTGTTNTGAGGN
ATNGATGAGATGATGTATGT

FIG. 1b

FIG. 2

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLVLGSVL
SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFA
VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF
PHLELELNENIVSAVEPGAFFNNLNLRTL
GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI
VILLDYMFDLYNLKSLEVGDNLDLYISHR
AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTREALSHLH
GLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLKVLEI
SHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCNLT
AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM
LHELLRLQBIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNY
LRVLNVSGNQLTTLEESVFHSGVGNLETLIL
DSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFRNRQQPT
CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRA
RIRDRAKAAQVFVDEGHTVQFVCRADGDPP
PAILWLSPRKHLVSAKSNRGLTVFPDGTLE
VRYAQVDNGTYLCIAANAGGNDSPAH
HVRSYSPDWPHQPNTFAFISNQPGEGEA
NSTRATVPFPFDIKTLIATTMGFISFLGVV
LFCLVLLFLWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKS
DAGISSADAPRKFNMKMI

FIG. 3

ATGCTGGCAGGGGGTATGAGAAGCATGCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCA
 GCCCATCCTCCTGCTGGTACTGGGCTCAGTGCTGTCAGGCTCTGCTACAGGCTG
 CCGCCCGCTGCGAGTGCTCAGCGCAGGACCGAGCCGTGCTCTGCCACCGCA
 AACGCTTTGTGGCGGTGCCGAGGGCATCCCCACCGAGACTCGCCTGCTGGAC
 CTGGGCAAAAACCGCATCAAGACACTCAACCAGGACGAGTTTGCCAGCTTCCC
 ACACCTGGAGGAGCTAGAACTCAATGAAAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCA
 GGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTGAGGACTCTGGGGCTGCGCAGCAACCG
 CCTGAAGCTTATCCCGCTGGGCGTCTTACC CGCCTCAGCAACTTGACCAAGCT
 GGACATCAGTGAGAACAAGATCGTCATCCTGCTAGACTACATGTTCCAAGACC
 TATAACAACCTCAAGTCGCTGGAGGTCGGCGACAACGACCTCGTCTACATCTCC
 CATCGAGCCTTCAGCGGCCTCAACAGCCTGGAAACAGCTGACGCTGGAGAAATG
 CAATCGACCTCCATCCCCACGGAGGGCGCTCTCCACCTGCACGGCCTCATCGT
 CCTGCGGCTACGACATCTCAACATCAATGCCATCAGGGACTACTCCTTCAAGA
 GGCTGTACCGACTTAAGGTCTTAGAGATCTCCCACTGGCCCTACCTGGACACCA
 TGACCCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACATCCCTATCCATCAACGACT
 GCAACCTGACAGCCGTGCCCTATCTGGCAGTGCCTCACCTGGTCTATCTCCGT
 TCCTCAACCTTTCCTACAACCCAATCGGTACAATCGAGGGCTCCATGCTGCATG
 AGCTGCTGCGGTTGCAGGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTG
 GAGCCCTATGCCTTTCGTGGGCTCAACTACCTGCGTGTGCTCAATGTCTCTGGC
 AACAGCTGACCACCCTGGAGGAGTCAGCCTTCCATTCCGGTGGGCAACCTGGA
 GACGCTCATCCTGGACTCCAACCCACTGGCCTGTGACTGCCGGCTGCTGTGGGT
 GTTCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTCAACAGGCAGCAGCCACCTGCGCCA
 CACCTGAGTTCGTCCAGGGCAAAGAGTTCAAGGACTTTCGGATGTA CTCTA
 CCCAACTACTTCACTGCCCGCGGCCACATCCGGGACCGCAAGGCACAGCA
 GGTGTTTGTAGATGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTATGCCGGGCAGATGGCG
 ACCCTCCACCAGCTATCCTTTGGCTCTACCCCGCAAGCACTTGGTCTCGGCCA
 AGAGCAATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTAC
 GCCAGGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCAGCCAATGCTGGCGG
 CAACGACTCCATGCCCGCCACTTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCTGACTGGCC
 CCATCAACCCAACAAGACCTTGCCTTCATCTCCAACCAGCCAGGCGAGGGAG
 AGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCITTCCTTCGACATCAAGACGCTC
 ATTATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCCTTCCCTGGGCGTTGTCTATTCTGCC
 TGGTGCTGCTGTTTCTATGGAGCCGGGGCAAAGGCAACACAAAGCACAAACATC
 GAAATTGAGTATGTGCCCGGAAATCGGACGCAGGCATCAGCTCAGCTGATGC
 ACCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGA

FIG. 4

M L A G G M R S M P S P L L A C W Q P I L L L V L
 G S V L S G S A T G C P P R C B C S A Q D R A V L
 C H R K R F V A V P E G I P T E T R L L D L G K N
 R I K T L N Q D E F A S F P H L B E L E L N E N I
 V S A V E P G A F N N L F N L R T L G L R S N R L
 K L I P L G V F T G L S N L T K L D I S E N K I V
 I L L D Y M F Q D L Y N L K S L E V G D N D L V Y
 I S H R A F S G L N S L E Q L T L E K C N L T S I
 P T E A L S H L H G L I V L R L R H L N I N A I R
 D Y S F K R L Y R L K V L E I S H W P Y L D T M T
 P N C L Y G L N L T S L S I T H C N L T A V P Y L
 A V R H L V Y L R F L N L S Y N P I G T I E G S M
 L H E L L R L Q E I Q L V G G Q L A V V E P Y A F
 R G L N Y L R V L N V S G N Q L T T L E E S A F H
 S V G N L E T L I L D S N P L A C D C R L L W V F
 R R R W R L N F N R Q Q P T C A T P E F V Q G K E
 F K D F P D V L L P N Y F T C R R A H I R D R K A
 Q Q V F V D E G H T V Q F V C R A D G D P P P A I
 L W L S P R K H L V S A K S N G R L T V F P D G T
 L E V R Y A Q V Q D N G T Y L C I A A N A G G N D
 S M P A H L H V R S Y S P D W P H Q P N K T F A F
 I S N Q P G E G E A N S T R A T V P F P F D I K T
 L I I A T T M G F I S F L G V V L F C L V L L F L
 W S R G K G N T K H N I B I B Y V P R K S D A G I
 S S A D A P R K F N M K M I

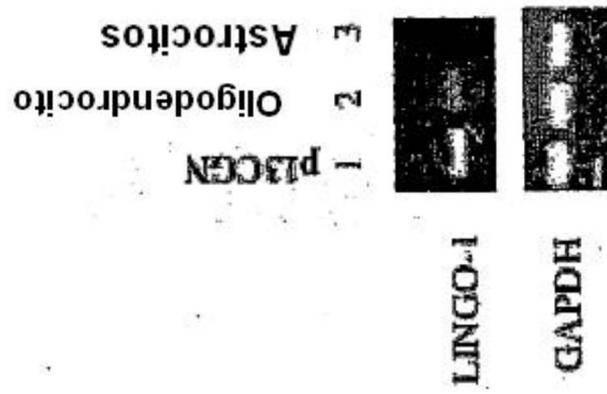


Figura 5

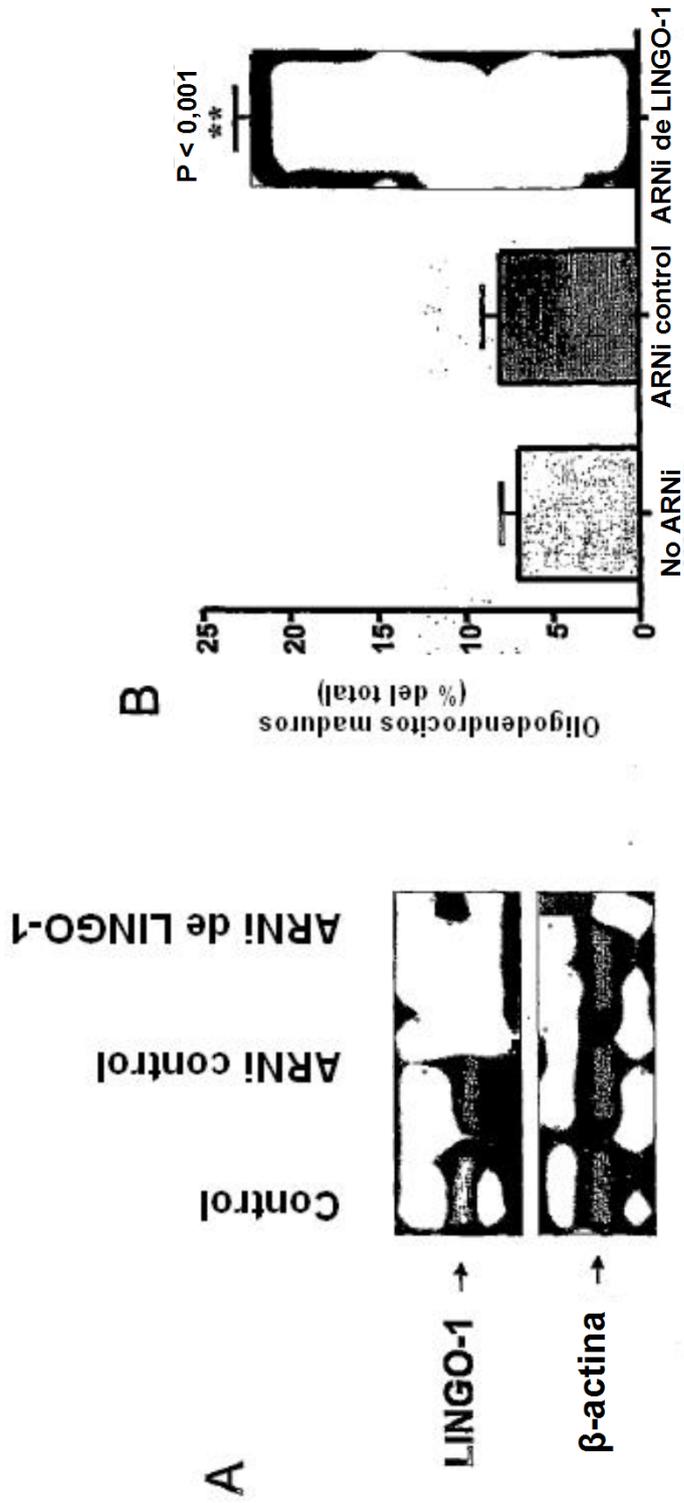


Figura 6

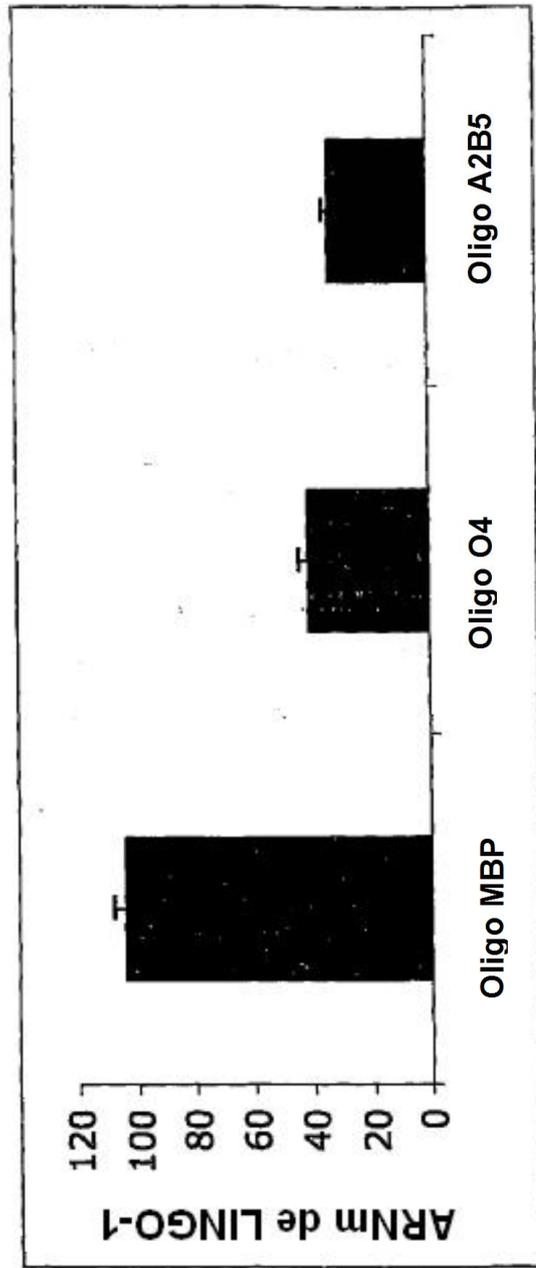


Figura 7

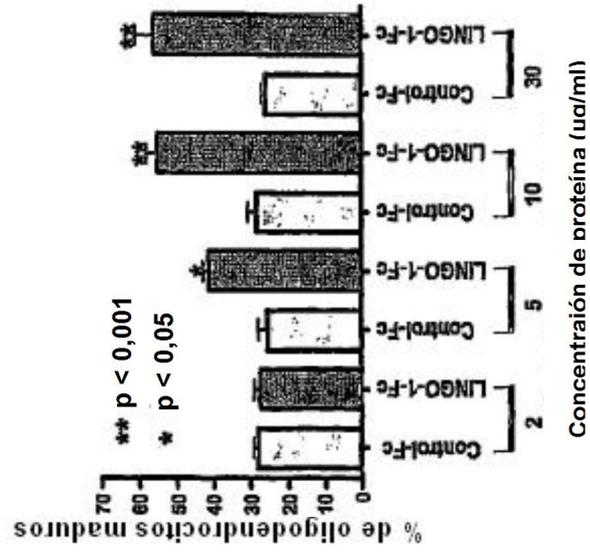


Figura 8

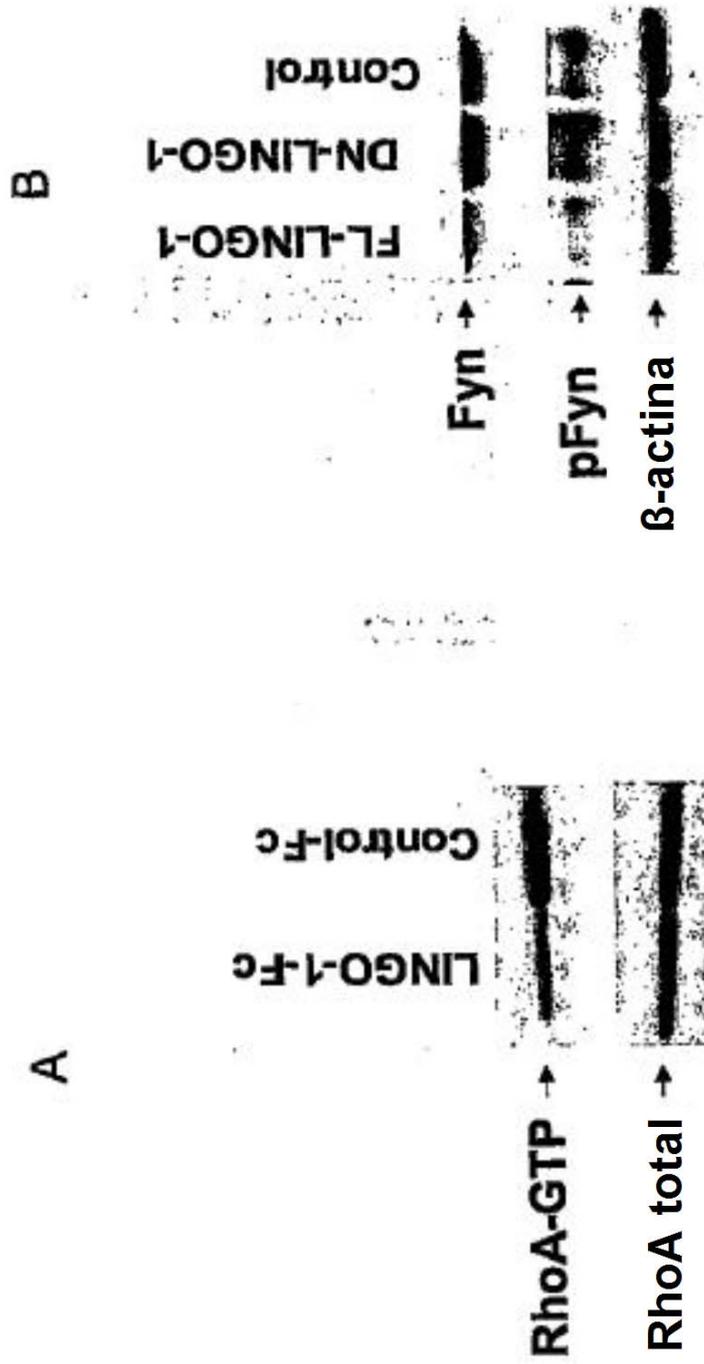


Figura 9

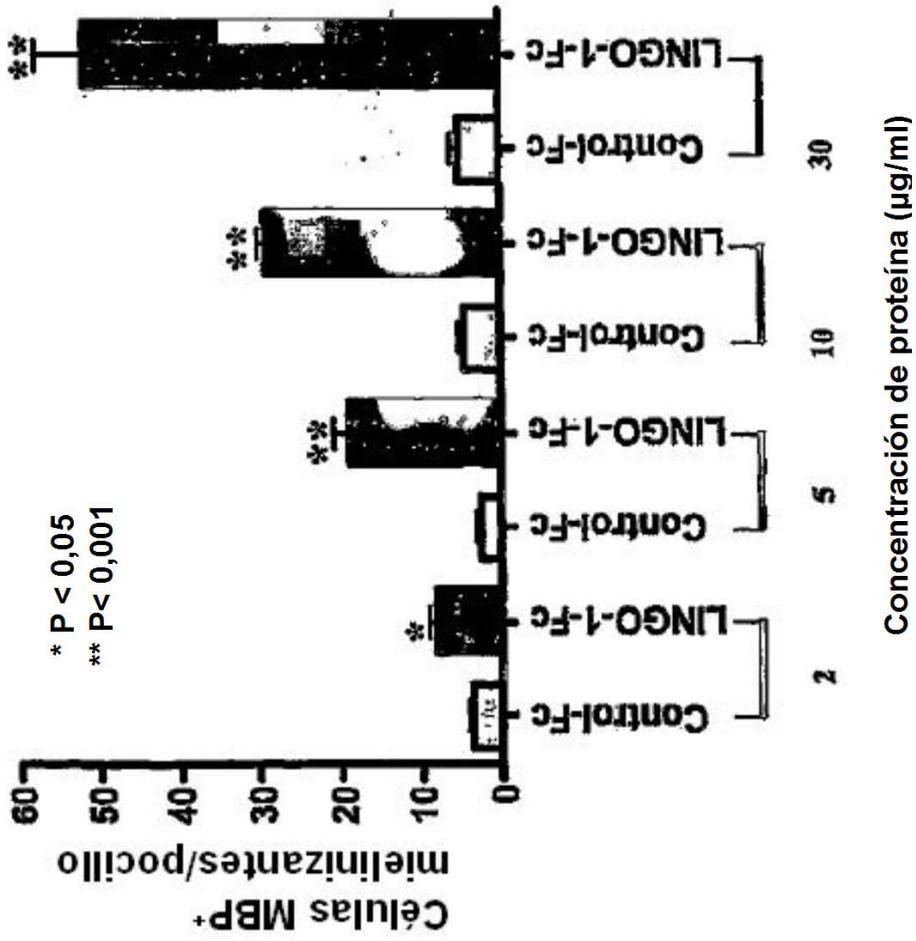


Figura 10A

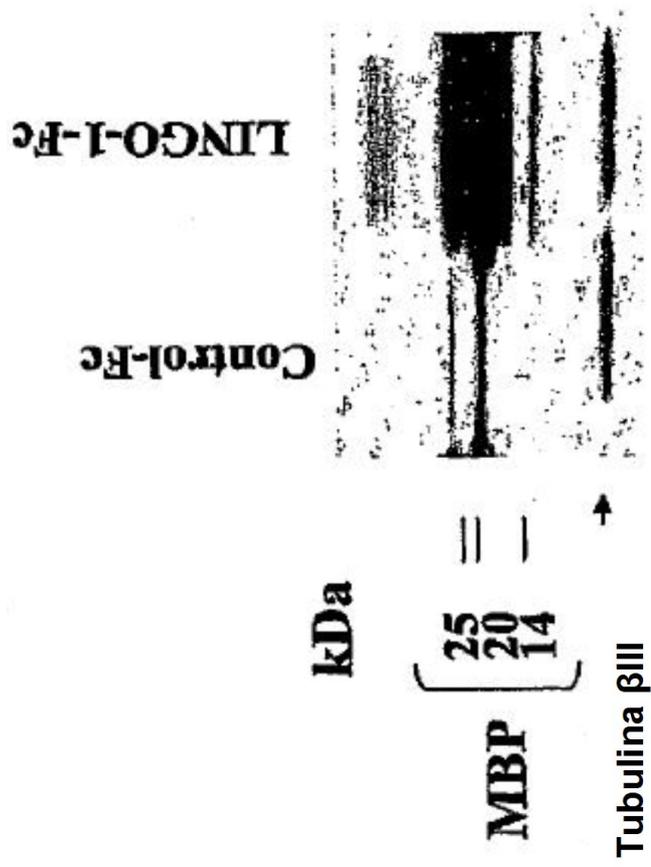


Figura 10B

LINGO-1 soluble potencia los axones mielinizantes de los oligodendrocitos

C: LINGO-1-Fc



D: Control-Fc

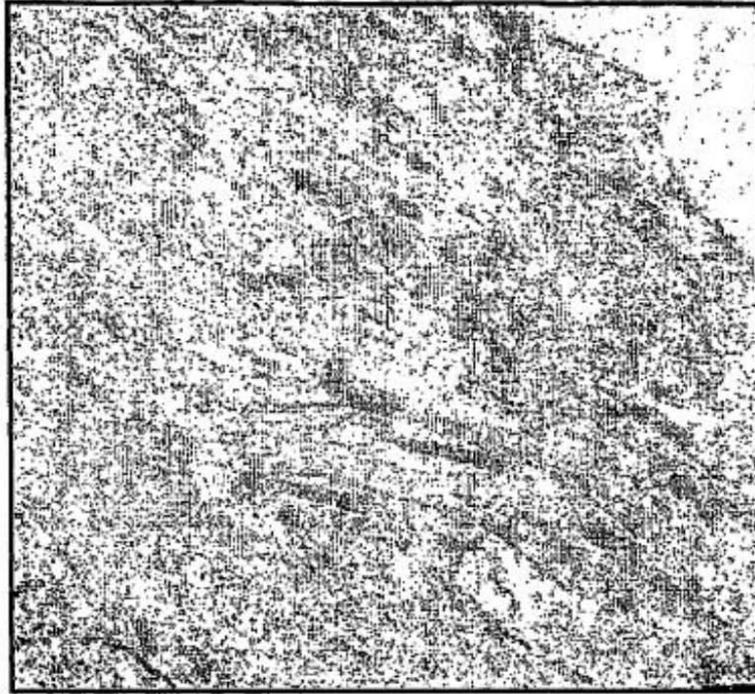


Figura 10C y 10D

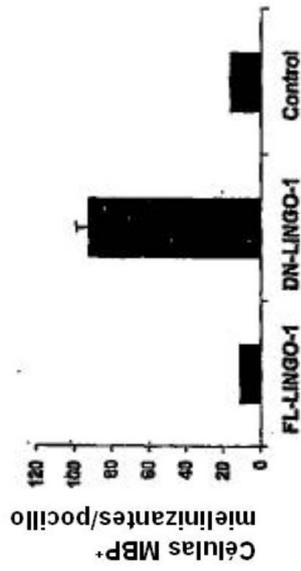


Figura 10E

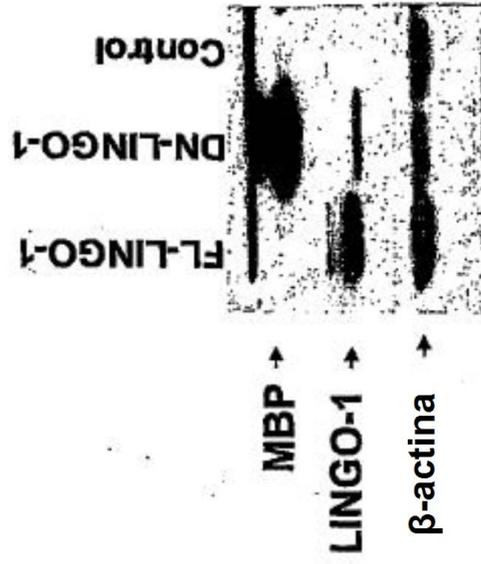


Figura 10F

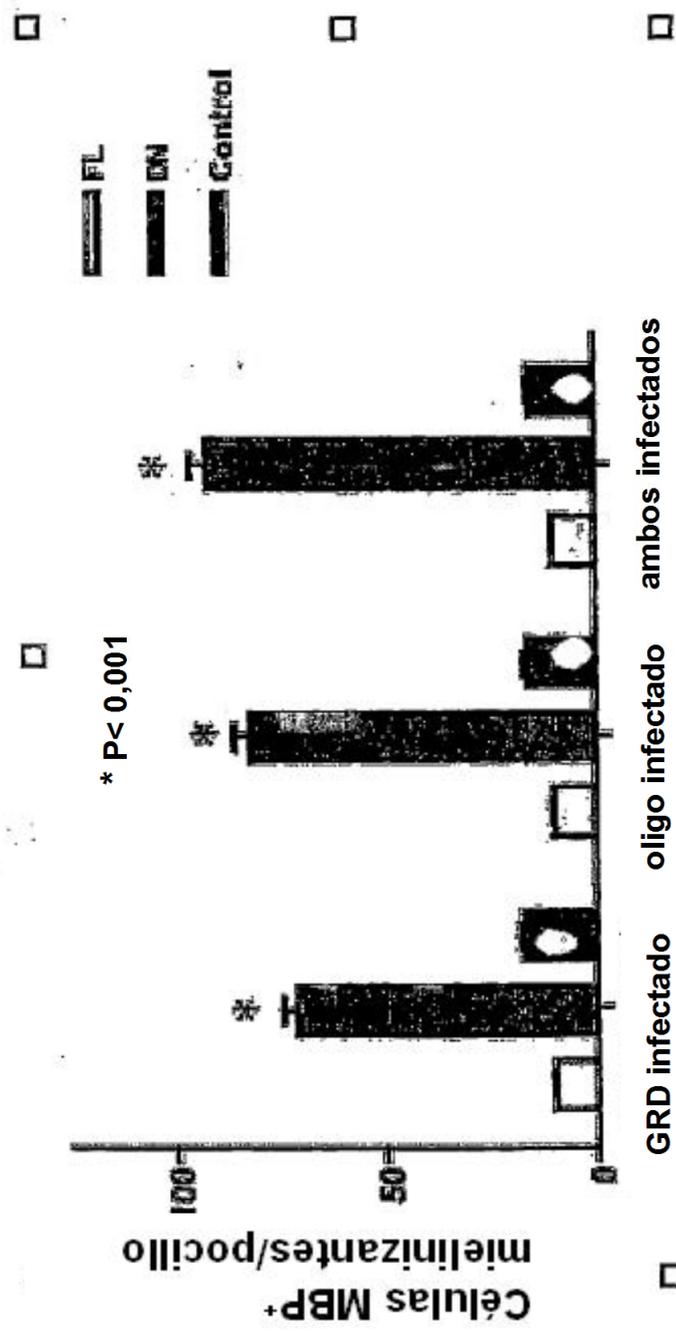


Figura 10G

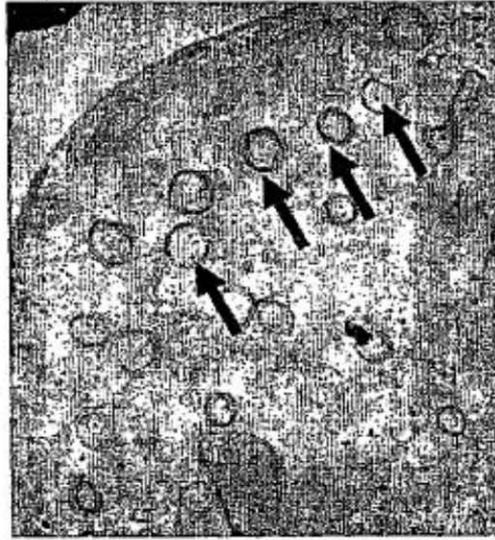
Los ratones con LINGO-1 desactivado muestran hipermielinización en la médula espinal

P1 (tipo natural)



A

P1 (LINGO-1 desactivado)



B

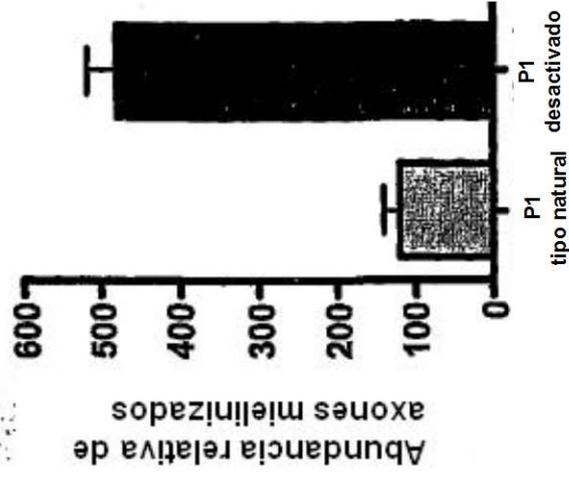


Figura 11

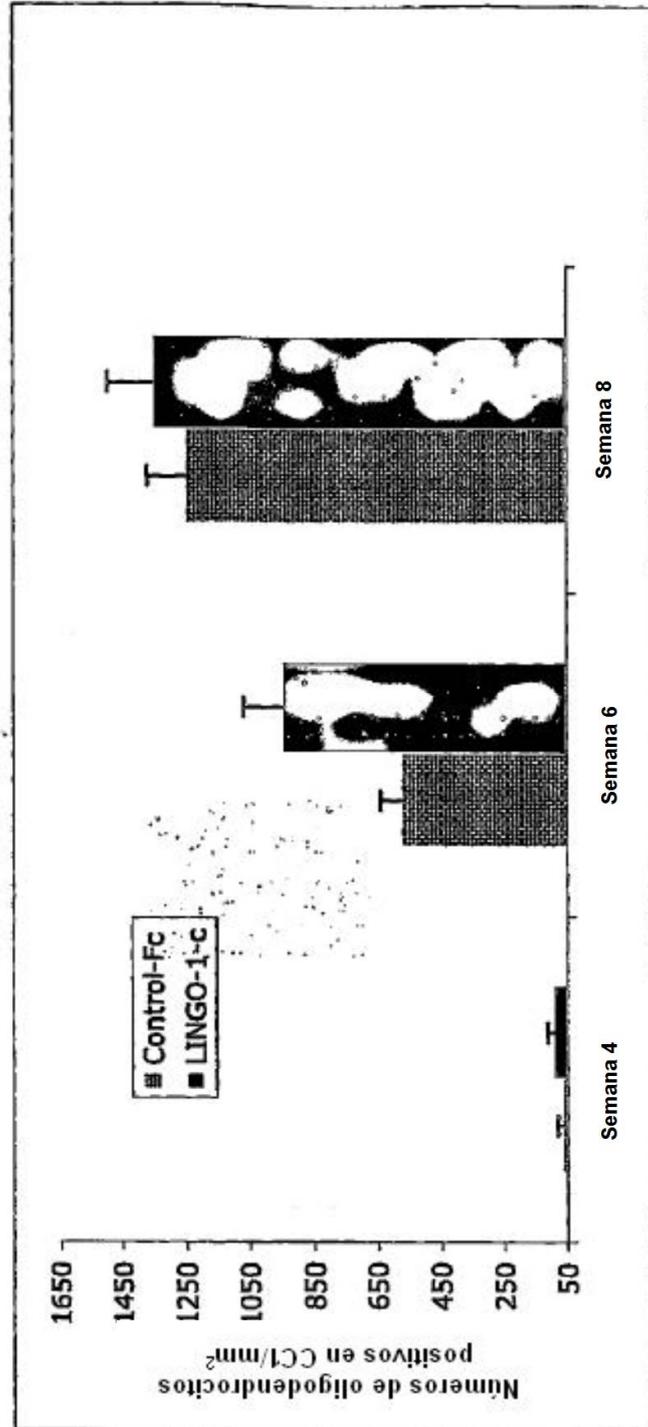


Figura 12

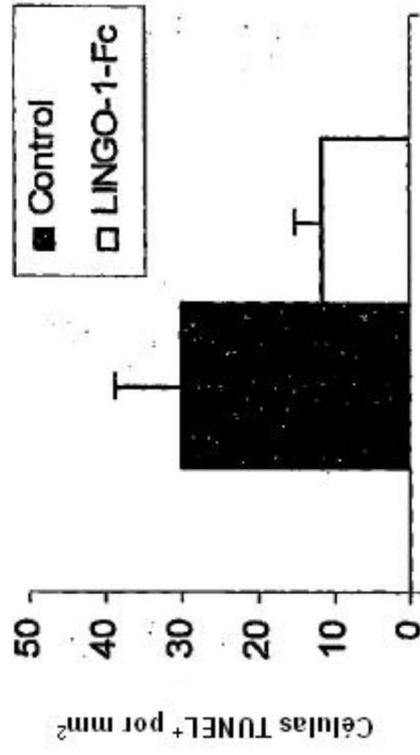


Figura 13

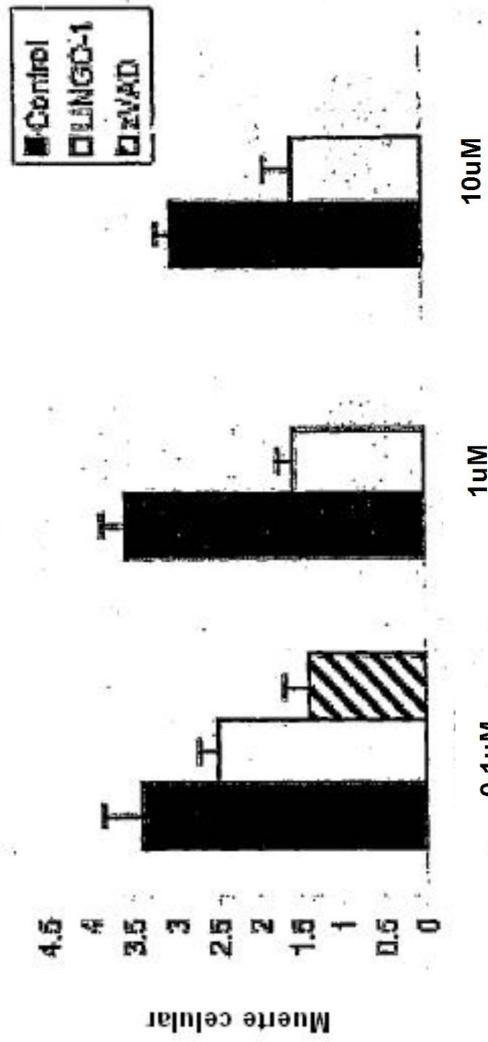


Figura 14

El dominio Ig de LINGO-1 potencia la mielinización en cocultivo

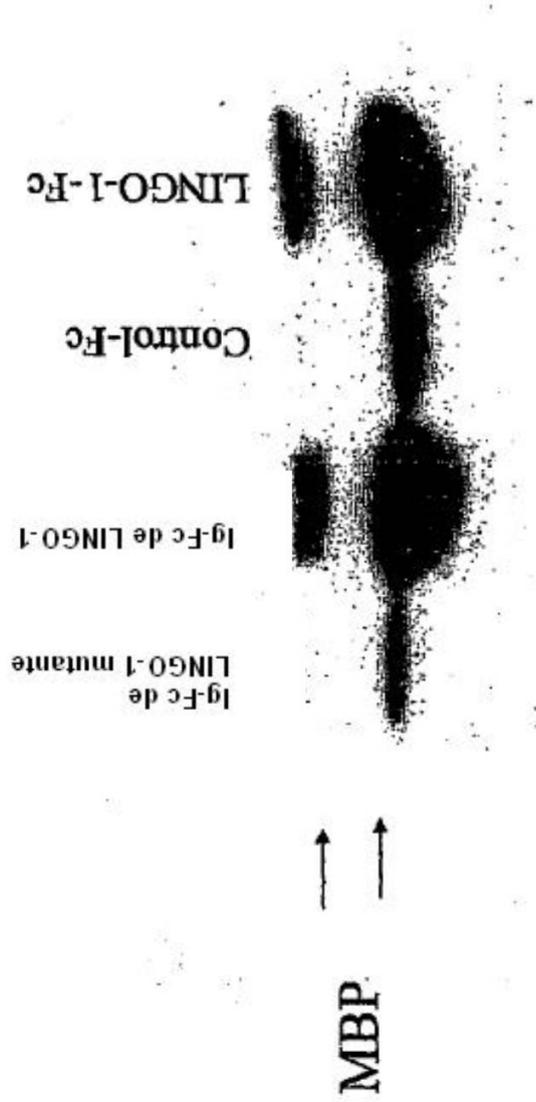


Figura 15

RKH del péptido LINGO-1 potencia la mielinización en cocultivo

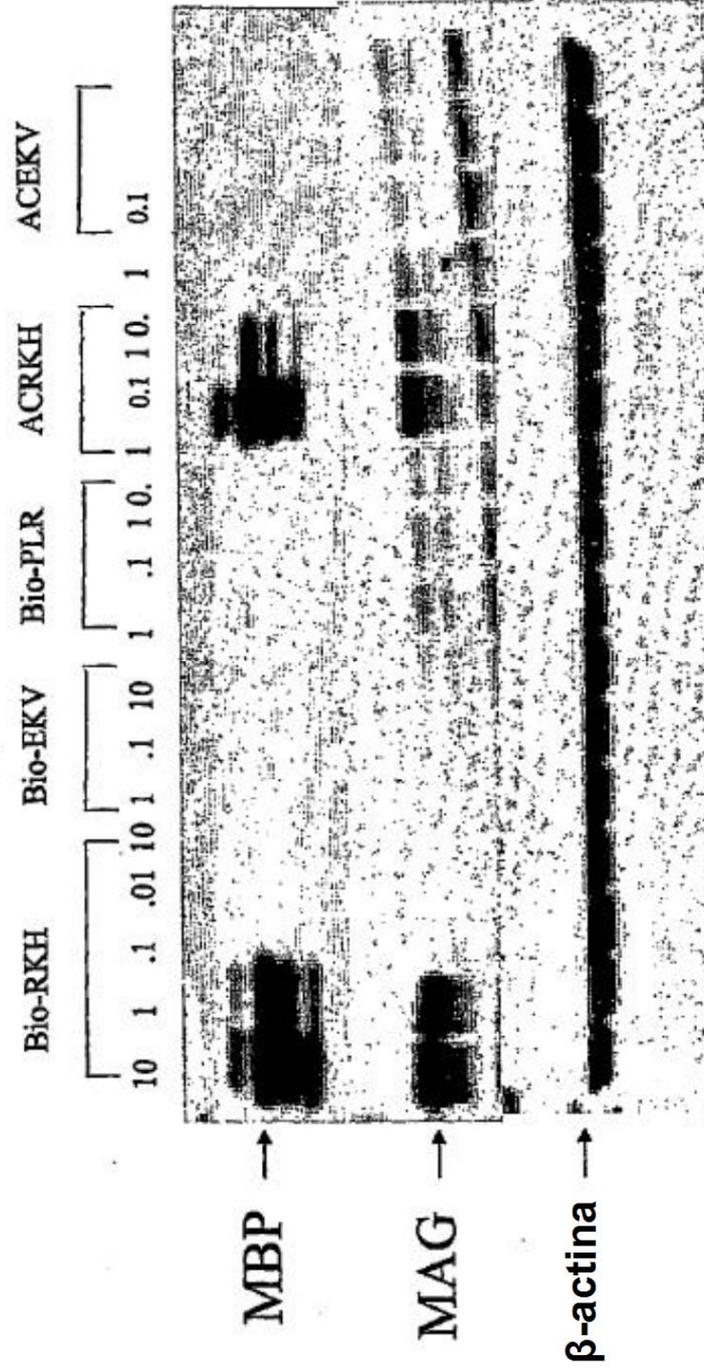


Figura 16