

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 768**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2008 E 08843849 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2207808**

54 Título: **Moléculas de unión a nogo-a mejoradas y uso farmacéutico de las mismas**

30 Prioridad:

**02.11.2007 EP 07119847**  
**02.11.2007 US 1741**

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

**17.10.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH y**  
**UNIVERSITY OF ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARSKE, CARMEN;**  
**FRENTZEL, STEFAN;**  
**MIR, ANIS KHURSO;**  
**SCHWAB, MARTIN E. y**  
**VITALITI, ALESSANDRA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 425 768 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

Moléculas de unión a nogo-a mejoradas y uso farmacéutico de las mismas

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con moléculas de unión a NogoA mejoradas, tal como por ejemplo, anticuerpos monoclonales, derivados o fragmentos Fab de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 La regeneración neuronal luego de lesión en el sistema nervioso central de adultos (SNC) se limita debido a la presencia del ambiente inhibitorio de mielina que envuelven los axones y la formación de tejido de cicatriz. En años recientes se han adquirido conocimientos importantes en la comprensión molecular del porqué el SNC es incapaz de repararse espontáneamente luego de lesión. Las moléculas inhibitorias en la mielina son el impedimento principal para la regeneración axonal, particularmente inmediatamente después de lesión. Hasta el momento NogoA, Glucoproteína Asociada con Mielina (MAG) y glucoproteína de oligodendrocito-mielina (OMgp) se han caracterizado como inhibidores potentes del crecimiento de neuritas. Adicionalmente, la mielina también contiene otros componentes inhibitorios, tal como proteoglicanos de sulfato de condroitina. El Nogo-A es un miembro de la familia de proteína de reticulón y tiene por lo menos dos dominios farmacológicamente distintos y biológicamente activos denominados Amino-Nogo y Nogo-66. Aunque el sitio del receptor para el primero no se conoce hasta ahora, el Nogo-66 inhibe el crecimiento neuronal in vitro e in vivo por medio del receptor neuronal NgR. Además del Nogo-66, el MAG y OMgp también se unen al NgR con alta afinidad e inhiben el crecimiento de neuritas.

20 Actualmente se siguen nuevos métodos de investigación para la mejora de reparación del nervio que incluyen digestión de tejido de cicatriz utilizando una condroitinasa de enzima ABC, técnicas de puenteado que utilizan células Olfativas envolventes y mastocitos y factores de crecimiento de proteína para estimular el crecimiento neuronal. Se pueden lograr acciones de bloqueo de los inhibidores de crecimiento de neuritas mediante la modulación de mediadores de señalización intracelular tal como Rho, una trifosfatasa de guanosina unida a membrana (GTPasa), que parece ser un enlace clave en la inhibición del crecimiento axonal. El monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) puede superar la inhibición asociada con mielina in vitro e induce la regeneración in vivo. El inhibidor de péptido del receptor NgR (NEP 1-40) se puede utilizar para inducir el recrecimiento neuronal y la recuperación funcional en ratas luego de lesión espinal.

30 Además del uso de los métodos descritos anteriormente, también se ha enfocado la atención en el uso de ciertos anticuerpos monoclonales para neutralizar las moléculas inhibitorias de crecimiento de neuritas del sistema nervioso central y periférico, en particular para neutralizar la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de NogoA. Sin embargo se ha mostrado que el anticuerpo monoclonal IN-1 o el fragmento IN-1 Fab del mismo induce el crecimiento de neuritas in vitro y mejora la germinación y la regeneración in vivo (Schwab ME et al. (1996) *Physiol. Rev.* 76, 319-370). También se han descrito anticuerpos alternativos para IN-1 en los documentos WO2004/052932 (11C7-Ab) y WO2005/028508 (3A6-Ab). La prueba de diferentes dominios del NogoA para la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas ha delineado diversos dominios inhibitorios en la molécula (Chen et al. (2000) *Nature* 403, 434-439; GrandPre et al., (2000) *Nature* 403, 439-444; Prinjha et al. (2000) *Nature* 403, 383-384).

40 Las inmunoglobulinas o anticuerpos naturales comprenden una molécula multimérica generalmente con forma de Y que tiene un sitio de unión a antígeno al final de cada brazo superior. El resto de la estructura, en particular el tallo de Y media las funciones efectoras asociadas con las inmunoglobulinas. Los anticuerpos consisten de 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Las cadenas pesada y ligera comprenden un dominio variable y una parte constante. Un sitio de unión a antígeno consiste del dominio variable de una cadena pesada asociada con el dominio variable de una cadena ligera. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera tienen la misma estructura general. Más particularmente, las características de unión a antígeno de un anticuerpo se determinan esencialmente por 3 regiones específicas en el dominio variable de las cadenas pesada y ligera que se denominan regiones hipervariables o regiones de determinación de complementariedad (CDR). Estas 3 regiones hipervariables alternan con 4 regiones de estructura (FR) cuyas secuencias se conservan relativamente y no está directamente implicadas en la unión. Los CDR forman bucles y se mantienen muy cerca las regiones de estructura principal que adoptan en gran medida una conformación de lámina  $\beta$ . Los CDR de una cadena pesada junto con los CDR de la cadena ligera asociada constituyen esencialmente el sitio de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo. La determinación de lo que constituye un FR o una región CDR se hace usualmente al comparar la secuencia de aminoácidos de una serie de anticuerpos producidos en la misma especie. Las reglas generales para identificar las regiones CDR y FR son de conocimiento general de un experto en la técnica y por ejemplo se puede encontrar en el sitio web ([www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/)).

55 En general, se presenta aún una necesidad clara de formas nuevas y mejoradas para inducir la regeneración del tejido neural luego de lesión en el sistema nervioso central del adulto (SNC).

Resumen de la invención

La invención está dirigida a un nuevo anticuerpo humano monoclonal con propiedades superiores para modular la actividad NogoA en experimentos in vitro e in vivo y con una influencia positiva en la regeneración neuronal luego de lesión en el sistema nervioso central del adulto (SNC). La invención por lo tanto proporciona nuevas moléculas de unión a la proteína NogoA o fragmentos de la misma.

En una realización, la invención por lo tanto proporciona una molécula aislada que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente al polipéptido NogoA humano (SEQ ID NO: 2) o NiG humano (SEQ ID NO: 3), dicho sitio de unión a antígeno comprende:

\* en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); y

\* en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13).

En todavía otra realización, la invención proporciona una molécula de unión que comprende:

\* por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10) y

(ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; y

\* por lo menos una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13) y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana.

En otra realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención tiene una constante de disociación < 1000nM.

En una realización alternativa de la molécula de unión de la invención, la parte constante o fragmento de la misma de la cadena pesada humana es del tipo  $\gamma 4$  y la parte constante o fragmento de la misma de la cadena ligera humana es del tipo  $\kappa$ .

En una realización adicional, la molécula de unión de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal humano o quimérico o humanizado.

En todavía otra realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención comprende una o más secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 4 (IgG1 pesado), SEQ ID NO: 5 (IgG1 ligero), SEQ ID NO: 24 (IgG4 pesado) y SEQ ID NO: 25 (IgG4 ligero).

Adicionalmente, la invención también proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula de unión de acuerdo con la invención.

En ciertas realizaciones, dicho polinucleótido aislado de la invención comprende:

\* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; o

\* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

En realizaciones preferidas, dicho polinucleótido de la invención comprende:

\* una secuencia de polinucleótidos que comprende en secuencia SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; y

\* una secuencia de polinucleótidos que comprende en secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

En todavía otra realización preferida, dicho polinucleótido de la invención comprende:

\* la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 6 y/o la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 7, o,

\* la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 26 y/o la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 28.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención como se definió anteriormente.

5 Adicionalmente, la invención proporciona un sistema de expresión que comprende el vector de expresión como se definió anteriormente, en donde dicho sistema de expresión o parte del mismo es capaz de producir un polipéptido de la invención como se definió anteriormente, cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula anfitriona compatible.

10 Adicionalmente, la presente invención también proporciona una célula anfitriona aislada que comprende el vector como se definió anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona una composición aislada que comprende la molécula de unión de acuerdo con la invención y un portador.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona una composición aislada que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención, y un portador.

15 Adicionalmente, la presente invención también proporciona una composición aislada que comprende el vector de expresión de acuerdo con la invención, o una célula anfitriona de acuerdo con la invención.

La invención proporciona adicionalmente un método para administrar una molécula de unión de acuerdo con la invención a una persona en necesidad de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC).

20 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con la invención, una polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de expresión o sistema de expresión de acuerdo con la invención, respectivamente, o una célula anfitriona de acuerdo con la invención, en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En cierta realización, dicha composición farmacéutica es una composición de liberación lenta.

25 La invención proporciona adicionalmente un método para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC) que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad efectiva de una molécula de unión de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de expresión o sistema de acuerdo con la invención, respectivamente, o una célula anfitriona de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa  
30 seleccionada del grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Esclerosis amiotrófica lateral (ALS), patologías como Lewy u otra demencia en general, enfermedades luego de trauma craneal, cerebral o espinal, apoplejía y una enfermedad desmielinizante. En una realización preferida adicional, la enfermedad desmielinizante se selecciona del grupo que consiste de esclerosis múltiple, desmielinación monofásica, encefalomiélitis, leucoencefalopatía multifocal, panencefalitis, enfermedad de Marchiafava-Bignami, mielomielosis pontina, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, Degeneración esponjosa, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, leucodistrofia metacromática y enfermedad de Krabbe.  
35

Alternativamente, la enfermedad es un trastorno ocular degenerativo que puede implicar directamente o indirectamente la degeneración de células retinales o de córnea. En una realización preferida, el trastorno ocular degenerativo se selecciona del grupo que consiste de retinopatías isquémicas, neuropatía óptica isquémica anterior, neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, edema macular quístico (CME), retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt, degeneración retinal viteliforme de Best, amaurosis congénita de Leber y otras degeneraciones retinales hereditarias, miopía patológica, retinopatía del prematuro, y neuropatía óptica hereditaria de Leber, los efectos posteriores de trasplante de córnea o de cirugía de córnea refractiva, y queratitis por herpes.  
40

45 Alternativamente, la enfermedad es una afección psiquiátrica. Preferiblemente, dicha afección psiquiátrica se selecciona del grupo que consiste de esquizofrenia y depresión.

En los métodos de tratamiento como se indicó anteriormente, la administración se realiza preferiblemente intracranialmente o intratecalmente.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para producir la molécula de unión de acuerdo con la invención, que comprende expresar el polinucleótido de acuerdo con la invención en un vector de expresión o sistema de acuerdo con la invención, por medio de tecnología de ADN recombinante o por medio de síntesis química.

- 5 Adicionalmente, la invención proporciona un método para administrar la composición farmacéutica de acuerdo con la invención localmente en el sitio de una lesión.

Finalmente, la invención también proporciona un método que comprende administrar uno o más de los siguientes productos seleccionados del grupo que consiste de: una molécula de unión de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de expresión o sistema de acuerdo con la invención, una célula anfitriona de acuerdo con la invención, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC).

10

La invención proporciona adicionalmente un método para producir una molécula de unión de la invención y un polinucleótido, un vector de expresión, por medio de tecnología de ADN recombinante o por medio de síntesis química que codifica dicha molécula de unión.

- 15 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión o sistema o una célula anfitriona de acuerdo con la presente invención en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. También proporciona productos que contienen dicha molécula de unión, polinucleótido, vector de expresión o sistema o dicha célula anfitriona, o un derivado farmacológicamente aceptable del mismo, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC).
- 20

También se prevé un método para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC) que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad efectiva de una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión o sistema o una célula anfitriona de la presente invención.

- 25 La presente invención indica adicionalmente en los ejemplos que las composiciones farmacológicas y los productos se pueden utilizar para la liberación lenta de la molécula de unión y/o para depósito local de la molécula de unión en el sitio de la lesión.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

- 30 El nucleótido (SEQ ID NO 7) y el aminoácido (SEQ ID NO 5) que codifica las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo 6A3-IgG1. La sección subrayada indica el péptido líder (SEQ ID NO 22) y la secuencia de nucleótidos que lo codifica (SEQ ID NO 23).

Figura 2

- 35 La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 6) y aminoácidos (SEQ ID NO 4) que codifica las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo 6A3-IgG1. La sección subrayada indica el péptido (SEQ ID NO 20) y la secuencia de nucleótidos que lo codifica (SEQ ID NO 21).

Figura 3

Las regiones codificantes de la parte variable ligera (SEQ ID NO 28; superior) y pesada (SEQ ID NO 26; inferior) de 6A3-Ig4.

- 40 Figura 4

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO 24; inferior) y ligera (SEQ ID NO 25,) de la parte variable y constante 6A3-Ig4. El péptido líder de la cadena ligera (SEQ ID NO 31) y pesada (SEQ ID NO 30) se indica en cursiva.

Figura 5

Superior: aminoácido de cadena ligera de anticuerpo 6A3-IgG1 (SEQ ID NO 5) con las secuencias líder (SEQ ID NO 22) y CDR-L1 (SEQ ID NO 11), CDR-L2 (SEQ ID NO 12) y CDR-L3 (SEQ ID NO 13).

Inferior: aminoácido de cadena pesada de anticuerpo 6A3-IgG1 (SEQ ID NO 4) con las secuencias líder (SEQ ID NO 20) y CDR-H1 (SEQ ID NO 8), CDR-H2 (SEQ ID NO 9) y CDR-H2 (SEQ ID NO 10).

5 Figura 6

RT-PCR utilizando el ARN MO3.13 como plantilla y los cebadores específicos Nogo-A resultan en un fragmento de ADN distinto de aproximadamente 200 bp.

Figura 7

10 La detección de inmunotransferencia de Nogo-A inmunoprecipitado de lípidos de célula M03:13 utilizando el anticuerpo 6A3.

Después de inmunoprecipitación (IP) de los lisados celulares MO3.13 e inmunodetección con el anticuerpo anti Nogo-A 6A3 se detecta una banda fuerte única del tamaño esperado (190kDa) para el anticuerpo 6A3-IgG4 (línea 4) y 11C7- IgG1 (línea 6).

Figura 8

15

Figura 8a: Tinción inmunofluorescente de células M03.13.

Figura 8b: Tinción inmunofluorescente de células HOG.

20 La tinción inmunofluorescente de células permeabilizadas MO3.13 y células HOG con el anticuerpo secundario anti-humano marcado 6A3-IgG4 y Alexa-Flúor 488 resultan en tinción muy brillante de las células (Figura 8a y 8b, parte izquierda), mientras no se detecta virtualmente la señal solo con el anticuerpo secundario (parte derecha).

Figura 9

Las concentraciones de suero de anticuerpo 6A3 se miden en 6 sujetos hasta dos meses.

Figura 10

Las concentraciones de CSF de anticuerpo 6A3 se miden en 6 sujetos hasta dos meses.

25 Figura 11

El tratamiento de anticuerpo 6A3 en modelo SCI de mono mejora el índice y grado de recuperación funcional independientemente del tamaño de la lesión.

Descripción detallada de la invención

30 En la búsqueda de nuevas y mejoradas formas para proporcionar la regeneración neuronal luego de lesión en el sistema nervioso central de adultos (SNC), ahora se ha encontrado sorprendentemente que se genera un anticuerpo humano monoclonal 6A3 novedoso en el HuMab-mouse™ por Medarex Inc, ratones genéticamente reconstituidos en donde los genes de inmunoglobulina humana reemplazan sus contrapartes de murino, tiene propiedades superiores en la modulación de la actividad NogoA en experimentos in vitro e in vivo. El 6A3 surge contra el NiG humano, es del isotipo IgG y tiene propiedades mejores que los anticuerpos NogoA descritos en la técnica anterior.

35 Ahora es posible construir otras moléculas de unión NogoA que tienen las mismas regiones hipervariables como dicho anticuerpo 6A3, creando nuevos anticuerpos que tienen las propiedades ventajosas de 6A3. Los derivados de 6A3-Ab, 6A3-IgG4 y 6A3-Fab reconocen el NiG humano con una alta afinidad de 0.14nM y 1.1 nM, respectivamente. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención muestran una alta estabilidad y se extienden en retención y vida útil alta in vitro e in vivo. Finalmente las moléculas de unión y anticuerpos de la invención visualizan la liberación

40 lenta del sitio de introducción, haciendo depósitos locales de las moléculas de unión en el sitio de posible lesión. Se han detectado altas concentraciones cerebroespinales (CSF) del anticuerpo 6A3 en lesión de médula espinal de animales y pacientes mediante infusión continuas. Esta retención 6A3-Ab sorprendentemente alta y residencia en, por ejemplo, el fluido cerebroespinal hace posible utilizar inyecciones de bolo (de por ejemplo 1-3 veces por semana,

aunque pueden ser factibles incluso intervalos mayores de una vez por 2, 3 o 4 semanas) en lugar de infundir constantemente el anticuerpo en el fluido cerebroespinal. Se pueden utilizar inyecciones de bolo intratecales repetidas. En una realización preferida, la administración se hace aunque la administración intratecal, por ejemplo utilizando catéter externalizado conectado a una bomba portátil. En una realización preferida adicional, se utiliza inyección de bolo intratecal. La sección experimental ilustra las propiedades ventajosas de las moléculas de unión de la invención.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona moléculas de unión a NogoA o NiG (denominado aquí adelante como "moléculas de unión de la invención" o simplemente "Moléculas de unión"). Preferiblemente, la moléculas de unión de la invención unen la proteína humana NogoA (SEQ ID NO: 2, codificado por SEQ ID NO: 1) o proteína NiG humana (que es el fragmento inhibidor de crecimiento de neurita más potente de NogoA e inicia en el aminoácido No. 186 y finaliza en el aminoácido No. 1004 del NogoA humano, = SEQ ID NO: 3) preferiblemente con una constante de disociación (Kd) < 1000nM, o con un Kd hasta e incluye 100nM, más preferiblemente con un kd < 100 nM, o con un kd de hasta y que incluye 100nM, más preferiblemente con un kd < 10 nM, o con un kd de hasta y que incluye 10 nM. La reacción de unión se puede mostrar mediante métodos estándar (que incluyen ensayos cualitativos y cuantitativos) que incluye, por ejemplo, métodos Western blot, inmunoprecipitación y afinidad de biosensor (cf. Ejemplo 4). Adicionalmente, la unión de las moléculas de unión de la invención al NogoA humano y NiG humano, y la eficacia de estas moléculas de unión en los ensayos funcionales se puede mostrar en un ensayo de crecimiento de neurita, por ejemplo como se describe adelante.

Sin embargo, en una realización preferida adicional la moléculas de unión de la presente invención (en una concentración de 100 mg/ml, preferiblemente 10 mg/ml, más preferiblemente a 1.0 mg/ml incluso más preferiblemente a 0.1 mg/ml) mejora el número de neuritas de células de gránulo cerebelar de rata sobre un sustrato de extracto de proteína de cerebro de mono mediante por lo menos 20%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 80%, cuando se compara con el número de neuritas de células de gránulo cerebelar de rata que se tratan con un anticuerpo de control que no se une al polipéptido NogoA humano o polipéptido NiG humano (es decir tiene una constante de disociación > 1000 nM).

El reconocimiento específico del NogoA o NiG humano se garantiza cuando CDR-H1, CDR- H2 y CDR-H3 o CDR-L1, CDR- L2 y CDR-L3 están presentes en la molécula de unión de la presente invención. No obstante, se conoce por la persona experta que incluso la presencia de solo un dominio CDR en la molécula de unión puede ser suficiente para asegurar la unión específica para la molécula reconocida. La frase "por lo menos una de las regiones hipervariables" significa 1, o 2 o 3 regiones hipervariables.

La frase "sitio de unión a antígeno comprende en secuencia las regiones hipervariables" abarca un sitio de unión a antígeno en el que las regiones hipervariables no son contiguas entre sí; preferiblemente dichas regiones de anticuerpo se intercalan con regiones de estructura principal de anticuerpo, o con secuencias que son secuencias de estructura principal de no anticuerpo, preferiblemente regiones de estructura principal de anticuerpo humano.

De acuerdo con la presente invención la molécula de unión también puede comprender por lo menos un sitio de unión a antígeno, dicho sitio de unión a antígeno comprende:

\* en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); o

\* en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13);

De acuerdo con la presente invención la molécula de unión también puede comprender:

\* un primer sitio de unión a antígeno que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); y

\* un segundo sitio de unión a antígeno que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13);

De acuerdo con la presente invención la molécula de unión también puede comprender:

\* por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10) y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; y

\* por lo menos una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13) y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana;

5 En la molécula de unión de la presente invención la parte constante o fragmento de la misma de la cadena pesada humana puede ser del tipo gamma ( $\gamma$ ), preferiblemente el tipo gamma 4 ( $\gamma_4$ ) y la parte constante o fragmento de la misma de la cadena ligera humana puede ser del tipo lambda ( $\lambda$ ) o preferiblemente kappa ( $\kappa$ ). Adicionalmente, la molécula de unión de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal humano o quimérico o humanizado, parcialmente humano.

10 De acuerdo con la presente invención, la molécula de unión puede comprender una o más secuencias de polipéptidos como se muestra en cualquiera de la SEQ ID NO: 4 (IgG1 pesado), SEQ ID NO: 5 (IgG1 ligero), SEQ ID NO: 24 (IgG4 pesado) y SEQ ID NO: 25 (IgG4 ligero).

15 En una realización preferida adicional la molécula de unión de la presente invención comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno, dicho sitio de unión a antígeno comprende en secuencia, las regiones hipervariables CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 y CDR-H3-6A3; dicho CDR-H1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, dicho CDR-H2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, y dicho CDR-H3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10;

En un aspecto adicional de la invención, la molécula de unión de la invención comprende por lo menos:

20 a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 y CDR-H3-6A3; dicho CDR-H1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, dicho CDR-H2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y dicho CDR-H3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10; y

25 b) un segundo dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 y CDR-L3-6A3, dicho CDR-L1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, dicho CDR-L2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y dicho CDR-L3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; o

Más aún, la invención también proporciona la siguiente molécula de unión de la invención, que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende:

a) la región variable de la cadena pesada de 6A3 (SEQ ID NO: 4); o

30 b) la región variable de la cadena ligera de 6A3 (SEQ ID NO: 5),

Cuando el sitio de unión a antígeno comprende el primer y segundo dominios, estos se pueden ubicar en la misma molécula de polipéptido o, preferiblemente, cada dominio puede estar en una cadena diferente, el primer dominio es parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma y el segundo dominio es parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

35 Ejemplos de las moléculas de unión de la invención incluyen anticuerpos como se produce por células B o hibridomas y anticuerpos humanos o quiméricos o humanizados o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo F(ab')<sub>2</sub>; y fragmentos Fab, así como también los anticuerpos de dominio únicos o de cadena sencilla, como se describe en la publicación de patente Estadounidense US20070065440A1.

40 Como se utiliza aquí, un "anticuerpo de dominio único" es un dominio variable que se puede unir específicamente a un epítipo o un antígeno o un ligando independientemente de otro dominio de unión variable que se une al epítipo, antígeno o ligando. Un anticuerpo de dominio único puede estar presente en un homo o heteromultímero con otros dominios VH o VL en donde otros dominios no se requieren para la unión de antígeno por el anticuerpo de dominio único, es decir, cuando el anticuerpo de dominio único se une al antígeno independientemente de los dominios VH o VL adicionales. En una realización preferida, un anticuerpo de dominio único, comprende un dominio único VH aislado o un dominio único VL aislado. Las técnicas para obtener un anticuerpo de dominio único con por lo menos alguna especificidad de unión del anticuerpo intacto del que se derivan se conocen en la técnica. Por ejemplo, Ward, et al., in "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli," Nature 341:644-646, describe un método de detección para obtener una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de dominio único VH) con suficiente afinidad para su epítipo objetivo para unirse en forma aislada.

50

Un anticuerpo de cadena sencilla consiste de los dominios variables/regiones de un anticuerpo de cadenas ligera y pesada unido covalentemente por un ligador de péptido que consiste usualmente de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Los métodos preferidos incluyen el uso de ligadores de polipéptido, como se describe, por ejemplo, en relación con moléculas scFv (Bird et al., (1988) Science 242:423-426). Por lo tanto, dicha estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera y se considera que el espaciador de péptido pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante completa. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que las regiones constantes de el anticuerpo de cadenas pesada o ligera o ambos, o ambos, tienen un origen de una primera especie, mientras que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera tienen un origen de una segunda especie. Preferiblemente, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo en el que las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, o ambos, son de origen humano mientras que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera son de origen no humano (por ejemplo murino, mono, rata, cerdo, ratón, pollo, aviar.). "Anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDR) son de origen no humano (por ejemplo murino), mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir las regiones de estructura principal, son de origen humano. Sin embargo un anticuerpo humanizado puede retener unos pocos aminoácidos de la secuencia de murino en las partes de las regiones de estructura principal adyacentes a las regiones hipervariables.

Las regiones hipervariables se puede asociar con cualquier tipo de regiones de estructura principal, preferiblemente de origen de murino o humano. Las regiones de estructura principal adecuadas se describen en "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E.A. et al, US department of health and human services, Public health service, National Institute of Health. Preferiblemente la parte constante de una cadena pesada humana de la moléculas de unión puede ser del tipo IgG, más preferiblemente el tipo IgG4, incluyendo los subtipos, preferiblemente la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo lambda ( $\lambda$ ) o kappa ( $\kappa$ ), más preferiblemente del tipo kappa ( $\kappa$ ).

Los anticuerpos monoclonales producidos contra una proteína encontrada en forma natural en todos los humanos se pueden desarrollar en un sistema no humano, por ejemplo, en ratones. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico como se produce por un hibridoma, cuando se administra a humanos, provoca una respuesta inmune indeseable, que está mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de dichos anticuerpos cuando no se pueden administrar durante un periodo prolongado. Por lo tanto se prefiere particularmente utilizar anticuerpos humanizados, quiméricos o de dominio único, de cadena sencilla que no provocan sustancialmente una respuesta alogénica sustancial cuando se administran a los humanos.

En vista de lo anterior, la molécula de unión de la invención también se puede seleccionar de un anticuerpo quimérico, que comprende por lo menos:

a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-6A3, CDR-H2- 6A3 y CDR-H3-6A3 y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; dicho CDR-H1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8), dicho CDRH2- 6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9), y dicho CDR-H3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10), y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 y CDR-L3-6A3 y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana; dicho CDR-L1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11), dicho CDR-L2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12), y dicho CDR-L3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13);

Alternativamente, se puede seleccionar una molécula de unión de la invención de una molécula de unión de cadena sencilla que comprende un sitio de unión un antígeno que comprende:

a) un primer dominio que comprende en secuencia el CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 y CDR-H3-6A3 hipervariable; dicho CDR-H1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8), dicho CDR-H2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9), y dicho CDR-H3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10); y

b) un segundo dominio que comprende en secuencia el CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 y CDR-L3-6A3 hipervariable; dicho CDR-L1-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11), dicho CDR-L2-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12), y dicho CDR-L3-6A3 tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13); y

c) un ligador de péptido que se une a la extremidad de terminal N del primer dominio y a la extremidad de terminal C del segundo dominio o a la extremidad de terminal C del primer dominio y a la extremidad de terminal N de segundo dominio.

La constante de disociación se puede probar convenientemente en diversos ensayos que incluyen, por ejemplo, el método de afinidad de biosensor (BIAcore) (visto anteriormente). Adicionalmente, el efecto de unión y funcional de la moléculas de unión se puede mostrar en un bioensayo, por ejemplo como se describe adelante.

5 La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo  $\gamma 1$ ;  $\gamma 2$ ;  $\gamma 3$ ;  $\gamma 4$ ;  $\alpha 1$ ;  $\alpha 2$ ;  $\delta$  o  $\epsilon$ , preferiblemente del tipo  $\gamma$ , más preferiblemente del tipo  $\gamma 4$ ; mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo  $\lambda$  o  $\kappa$  (que incluye los subtipos  $\lambda 1$ ;  $\lambda 2$ ;  $\lambda 3$ ; y  $\lambda 4$ ) pero es preferiblemente del tipo  $\kappa$ . La secuencia de aminoácidos de todas estas partes constantes se dan en Kabat et al (Supra).

10 Los conjugados de las moléculas de unión de la invención, por ejemplo conjugados de enzima o toxina o radioisótopo, también se incluyen dentro del alcance de la invención. En otro aspecto, una composición que contiene la molécula de unión NogoA o NiG se estabiliza in vivo mediante enlace o asociación con una unidad estructural estabilizante polimérica (no polipéptido), tal como glucosilación, como se puede obtener mediante procesos in vitro o in vivo. Ejemplos de este tipo de estabilización se describen, por ejemplo, en el documento WO99/64460 (Chapman et al.) y el documento EP1,160,255 (King et al.). Específicamente, estas referencias describen el uso de moléculas de polímero que ocurren en forma natural o sintética, tal como polialquileno, polialquilenos, polioxialquilenos o polisacáridos, para aumentar la vida útil in vivo de los polipéptidos de inmunoglobulina. Un ejemplo típico de una unidad estructural estabilizante es polietilenglicol, o PEG, un polialquileno. El proceso para unir PEG a un polipéptido de inmunoglobulina se describe en estas referencias y se denomina aquí como "PEGilación." Como se describe aquí, una molécula de unión NogoA o NiG se puede PEGilar aleatoriamente, mediante la unión de PEG a lisina u otros aminoácidos en la superficie de la molécula de unión NogoA o NiG, o específica de sitio, por ejemplo, a través de unión a PEG a un residuo de cisteína de superficie introducido artificialmente. Dependiendo de la molécula de unión NogoA o NiG, se puede preferir utilizar un método no aleatorio de unión a polímero, debido a la unión aleatoria, mediante unión en o cerca al sitio o sitios de unión a antígeno en la molécula frecuentemente altera la afinidad o especificidad de la molécula para su antígeno objetivo.

25 Se prefiere que la adición de PEG u otro polímero no interfiera con la afinidad o especificidad de unión a antígeno de la molécula de unión del anticuerpo NogoA o NiG. "No interfiere con afinidad o especificidad de unión a antígeno" significa que la molécula de unión NogoA o NiG unida a PEG tiene un IC50 o ND50 que no es mayor de 10% mayor que el IC50 o ND50, respectivamente, de una molécula de unión NogoA o NiG no unida a PEG que tiene el mismo dominio variable único de anticuerpo. En la alternativa, la frase "no interfiere con afinidad o especificidad de unión a antígeno" significa que la forma ligada PEG de la molécula de unión NogoA o NiG retiene por lo menos 90% de la actividad de unión a antígeno de la forma no PEGilada del polipéptido.

30 El PEG u otro polímero útil para aumentar la vida útil in vivo es aproximadamente de manera general 5,000 a 50,000 Daltons de tamaño, por ejemplo, aproximadamente 5,000 kD-10,000 kD, 5,000 kD-15,000 kD, 5,000 kD-20,000 kD, 5,000-25,000 kD, 5,000-30,000 kD, 5,000 kD-35,000 kD, 5,000 kD-40,000 kD, o aproximadamente 5,000 kD-45,000. La elección del tamaño de polímero depende del uso pretendido del complejo. Por ejemplo, en donde se desea penetrar el tejido sólido, por ejemplo, un tumor, es ventajoso utilizar un polímero más pequeño, en orden o aproximadamente 5,000 kD. Cuando, en su lugar, se desea mantener el complejo en circulación, se pueden utilizar polímeros más grandes, por ejemplo, 25,000 kD a 40,000 kD o más.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención puede incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una molécula de unión NogoA o Nig de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de unión NogoA o Nig de la invención puede variar de acuerdo con los factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula de unión de la invención NogoA o Nig de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que cualesquier efectos tóxicos o perjudiciales de la molécula de unión de la invención NogoA o Nig se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el efecto profiláctico deseado.

40 Como se utiliza aquí, la frase "se une específicamente" se refiere a la unión de un antígeno mediante una molécula de unión NogoA o Nig de la invención con una constante de disociación (Kd) de 1 mM o menor como se mide por análisis de resonancia de plasmón de superficie utilizando, por ejemplo, un sistema de resonancia de plasmón de superficie BIAcore(r) y software de evaluación cinética BIAcore(r).

45 "Polipéptido", si no se especifica de otra forma, incluye cualquier péptido o proteína que comprende los aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces de péptido, que tienen una secuencia de aminoácidos partiendo en la extremidad de terminal N y finalizando en la extremidad de terminal C. Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, se prefiere más un anticuerpo monoclonal quimérico (también denominado injertado a V) o humanizado (también denominado injertado a CDR). El anticuerpo monoclonal humanizado (injertado a CDR)

puede o no incluir mutaciones adicionales introducidas en las secuencias de estructura principal (FR) del anticuerpo receptor.

Un derivado funcional de un polipéptido como se utiliza aquí incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido para la presente invención, es decir que tiene la capacidad de unirse al NogoA humano o NiG humano. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos de péptido de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden las regiones dentro de la secuencia de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. El término "derivado" se utiliza para definir las variantes de la secuencia de aminoácidos, y modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo de una secuencia específica. Los derivados funcionales de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, por ejemplo de la región hipervariable de la cadena pesada y ligera, preferiblemente tienen por lo menos aproximadamente 90%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia general con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, y sustancialmente retiene la capacidad de unirse al NogoA humano o NiG humano.

Como se utiliza aquí, la frase "dominio variable" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia derivada de una región de inmunoglobulina V de línea germinal de mamífero. Una secuencia se "deriva de una región V de línea germinal de mamífero" cuando la secuencia se aísla de un individuo humano, se aísla de un animal no humano, tal como un roedor tal como un ratón, en el que el animal no humano es capaz de generar inmunoglobulinas humanas en respuesta a un inmunógeno, más preferiblemente dicho animal no humano no es capaz de producir anticuerpos endógenos para su especie, se aísla de un colección de secuencias de gen de anticuerpo humanas clonadas (o una colección de secuencias de gen de región V anticuerpo humanas), o cuando se utiliza una secuencia de región V de línea germinal humana clonada para generar una o más secuencias diversificadas (mediante mutagenia aleatoria u objetivo) que luego se seleccionan para unión a un antígeno objetivo deseado. A un mínimo, un dominio variable de inmunoglobulina humana tiene por lo menos 85 % de similitud de aminoácido (que incluye, por ejemplo, 87 %, 90 %, 93 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor similitud) a una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina humana que ocurre en forma natural. Alternativamente, o adicionalmente, "dominio variable" es un dominio variable de inmunoglobulina que comprende cuatro regiones de estructura principal de dominio variable inmunoglobulina (FW1-FW4) que son preferiblemente humanas, como las regiones de estructura principal establecidas por Kabat et al. (1991.). Las "regiones de estructura principal de dominio variable" abarcan a) una secuencia de aminoácidos de una región de estructura, preferiblemente humana, y b) una región de estructura que comprende por lo menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de una región de estructura humana. Un anticuerpo dominio variable puede comprender las secuencias de aminoácidos de FW1-FW4 que son iguales a las secuencia de aminoácidos de las regiones de estructura principal correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, preferiblemente humana, o también puede comprender un dominio variable en el que las secuencias FW1-FW4 que contienen colectivamente hasta 10 diferencias de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de la secuencia de aminoácidos) con relación a las secuencia de aminoácidos de las regiones de estructura principal correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, preferiblemente humana. Como se utiliza aquí, la frase "estructura universal" se refiere a una secuencia de estructura de anticuerpo única que corresponde a las regiones de un anticuerpo conservado en la secuencia como se define por Kabat et al. (1991) o que corresponde al repertorio o estructura de inmunoglobulina de línea germinal humano como se define por Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. La invención proporciona el uso de una estructura única, o un grupo de dichas estructuras, que se ha encontrado para permitir la derivación virtualmente de cualquier especificidad de unión a través de la variación en las regiones hipervariables solas. En una realización, las regiones hipervariables o CDR específicamente se unen NogoA y/o NiG. El término "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica; o un fragmento de la misma con un agente de derivación proteínico o no proteínico orgánico, fusiones a las secuencias de polipéptidos heterólogas, y modificaciones post-traduccionales. Los polipéptidos modificados covalentes, por ejemplo de una secuencia específica, aún tienen la capacidad de unirse al NogoA humano o NiG humano mediante entrecruzamiento. Las modificaciones covalentes se introducen tradicionalmente al hacer reaccionar los residuos de aminoácido objetivo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con los residuos terminales o laterales seleccionados, o mediante mecanismos de aprovechamiento de las modificaciones post-traduccionales que funcionan en las células anfitrionas recombinantes. Ciertas modificaciones post-traduccionales son el resultado de la acción de células anfitrionas recombinantes en el polipéptido expresado. Los residuos de glutamilo y asparagilo se desamidán frecuentemente post-transduccionalmente en los residuos glutamino y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan bajo condiciones levemente ácidas. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales lisina, arginina, e histidina, véase por ejemplo T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes pueden incluir las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tal como inmunoadhesinas, y fusiones de terminal N para las secuencias de señal heterólogas.

"Identidad" con respecto a un polipéptido natural y su derivado funcional se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido natural correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, lograr el porcentaje máximo de identidad, y que no considera cualquiera de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones de terminal N o C ni las inserciones se deben constituir como identidad de reducción. Se conocen bien los métodos y programas de ordenador para la alineación, véase Altschul et al. supra.

"Aminoácidos" se refiere a todos los aminoácidos L- $\alpha$  que ocurren en forma natural, por ejemplo y que incluyen los aminoácidos D. Los aminoácidos se identifican por las designaciones de tres letras o de una letra bien conocidas.

El término "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a las moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos como se compara con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, aún pueden tener la capacidad de unirse al NogoA humano o NiG humano. Las variantes sustitucionales son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido retirado y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Estas sustituciones pueden ser únicas, cuando solo un aminoácido en la molécula se ha sustituido, o pueden ser múltiples, cuando dos o más aminoácidos se han sustituido en la misma molécula. Las variantes insercionales son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado a el grupo funcional o-carboxi o  $\alpha$ -amino del aminoácido. Las variantes de eliminación son aquellas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, retirada. De forma ordinaria, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

Se puede producir una molécula de unión de la invención mediante técnicas de ADN recombinantes. En general, las moléculas de ácido nucleico y las construcciones de vector requeridas para el desempeño la presente invención se pueden construir y manipular como se establece en los manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA. En vista de esto, se puede construir una o más moléculas de ADN que codifican la molécula de unión, se ponen bajo las secuencias de control apropiadas y se transfieren en un organismo anfitrión adecuado para expresión.

En una forma muy general, de acuerdo con lo anterior se proporciona aquí,

(i) moléculas de ADN que codifican una región hipervariable, un sitio de unión a antígeno, una cadena de anticuerpo o fragmento de la misma, o una molécula de unión de dominio único de la presente invención; y

(ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de unión de la presente invención mediante medios recombinantes.

El actual estado de la técnica es tal que el experto será capaz de sintetizar las moléculas de ADN de la invención dando la información proporcionada aquí es decir las secuencia de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifica. Un método para construir un gen de dominio variable por ejemplo se describe en el documento EP 239 400 y se puede resumir brevemente como sigue: se clona un gen que codifica un dominio variable de un anticuerpo monoclonal de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables y de estructura y los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables se retiran de tal manera que los segmentos de ADN que codifican las regiones de estructura principal se fusionan junto con los sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagenia de la molécula de ADN mediante procedimientos estándar. Se preparan casetes CDR sintéticos de hebra doble mediante síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias dadas en CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3, CDR-H3-6A3, CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 y CDR-L3-6A3 anteriores. Estos casetes se proporcionan con extremos pegajosos de tal manera que se pueden ligar a las uniones de la estructura principal mediante protocolo estándar para lograr una molécula de ADN que codifica un dominio variable de inmunoglobulina.

Adicionalmente, no es necesario tener acceso al mRNA de una estirpe celular de hibridoma producida con el fin de obtener una construcción de ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención. Sin embargo la solicitud PCT W0 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un anticuerpo monoclonal mediante técnicas de ADN recombinantes dado solo información escrita como la secuencia de nucleótidos del gen.

El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método PCR, y su división para dar la secuencia de ADN deseada.

Están públicamente disponibles numerosos vectores, que incluyen plásmidos bacterianos, bacteriófago, cromosomas artificiales y vectores episómicos. Los vectores de expresión que comprenden uno o más promotores adecuados y/o genes que codifican las partes constantes de la cadena ligera y pesada están disponibles públicamente. Los vectores de expresión usualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo anfitrión y se une operablemente a la secuencia codificante de interés. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. El término "ligado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su forma pretendida. Una secuencia de control "ligada operablemente" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Sin embargo, una vez se prepara la molécula de ADN de la invención se puede transferir convenientemente en un vector de expresión apropiado.

También se pueden preparar moléculas de ADN que codifican anticuerpos de cadena sencilla mediante métodos estándar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 88/1649.

En una realización particular de la invención, los medios recombinantes para la producción de algunas de las moléculas de unión de la invención incluyen primera y segunda construcciones de ADN como se describe adelante:

15 El primer polinucleótido puede comprender:

\* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; o

\* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

20 Otro polinucleótido de acuerdo con la invención comprende:

\* una secuencia de polinucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; y

\* una secuencia de polinucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

En otra realización el polinucleótido comprende:

25 \* una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y/o una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7, o,

\* una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 y/o una secuencia de polinucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 28.

En todavía otra realización la construcción de ADN codifica una cadena pesada o fragmento de la misma y comprende:

30 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariables y de estructura, dichas regiones hipervariables comprenden en secuencia ADN-CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 14), ADN-CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 15) y ADN-CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 16); esta primera parte partiendo con el codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y finalizando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y

35 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón no codificante.

Preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena y4 humana. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprende intrones) o un fragmento de cADN (sin intrones).

40 En otra realización la construcción de ADN codifica una cadena ligera o fragmento de la misma y comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariables y de estructura; dichas regiones hipervariables que comprende en secuencia ADN-CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 17), ADN-CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 18) y ADN-CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 19), esta primera parte inicia con un codón

que codifica el primer aminoácido del dominio variable y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y

- 5 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de cadena ligera y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma seguido por un codón no codificante.

Preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena κ humana.

10 La construcción de ADN de la presente invención puede comprender adicionalmente ventajosamente comprende otra parte que se ubica en la dirección 5' de las partes ya descritas y que codifica un péptido líder; esta parte adicional parte del codón que codifica el primer aminoácido y finaliza con el último aminoácido del péptido líder. Este péptido líder se requiere para secreción de las cadenas mediante el organismo anfitrión en el que se expresan y se retira posteriormente por el organismo anfitrión. Preferiblemente, esa parte de la construcción de ADN codifica un péptido líder que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia líder de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 20 (cadena pesada de IgG1, partiendo con el aminoácido en la posición -19 y finaliza con el aminoácido en la posición -1), que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22 (cadena ligera de IgG1, partiendo con el aminoácido en la posición -20 y finaliza con el aminoácido en la posición -1), que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la secuencia líder como se muestra en la SEQ ID NO: 30 (cadena pesada de IgG4, partiendo con el aminoácido en la posición -19 y finaliza con el aminoácido en la posición -1), o, tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 31 (cadena ligera de IgG4, partiendo con el aminoácido en la posición -20 y finaliza con el aminoácido en la posición -1).

25 Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el control de las secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar el tipo de promotor, dado que se adapta al organismo anfitrión en el que las construcciones de ADN se transferirán para expresión. Sin embargo, si la expresión toma lugar en una célula de mamífero, se prefiere particularmente para utilizar el promotor de un gen inmunoglobulina.

30 El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Se puede obtener el animal transgénico adecuado de acuerdo con los métodos estándar que incluyen microinyectar en huevos la primera y segunda construcciones de ADN colocadas bajo las secuencias de control adecuadas que transfieren los huevos así preparados a hembras pseudo-preñadas apropiadas y seleccionar un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando se han producido las cadenas de anticuerpo en un cultivo celular, la construcción de ADN primero se pueden insertar a un vector de expresión único o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, se prefiere la última posibilidad.

35 De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicar en una estirpe celular eucariótica o procariótica que comprende por lo menos una de las construcciones de ADN descritas anteriormente.

40 La presente invención proporciona así un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. La presente invención también se relaciona con un sistema de expresión, en donde dicho sistema de expresión o parte del mismo es capaz de producir un polipéptido de la presente invención, cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula anfitriona compatible. También se describe una célula anfitriona aislada que comprende un sistema de expresión de la invención.

Un método para producir una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión, por medio de tecnología de ADN recombinante o por medio de síntesis química sin embargo también se prevé en la presente solicitud.

45 Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN así se transfiere a un organismo anfitrión adecuado. Cuando las construcciones de ADN se insertan de forma separada en dos vectores de expresión, se pueden transferir en forma separada, es decir un tipo de vector por célula, o se co- transfiere, se prefiere esta última posibilidad. Un organismo anfitrión adecuado puede ser una estirpe celular de bacteria, levadura o mamífero, se prefiere este último. Más preferiblemente, la estirpe celular de mamífero es de origen linfóide por ejemplo un mieloma, hibridoma o una célula B inmortalizada normal, pero no expresa cualquier anticuerpo endógeno de cadena ligera o pesada.

También se prefiere que el organismo anfitrión contenga un gran número de copias de los vectores que contienen una o más construcciones de ADN por célula. Si el organismo anfitrión es una estirpe celular de mamífero, este objetivo deseable se puede lograr al amplificar el número de copias de acuerdo con métodos estándar. Los métodos de amplificación consisten usualmente de seleccionar una resistencia aumentada a un fármaco, dicha resistencia se codifica por el vector de expresión.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir una molécula de unión multicadena de la invención, que comprende (i) cultivar un organismo que se transforma con por lo menos una construcción de ADN de la invención y (ii) recuperar las moléculas de unión activas de la invención del cultivo.

Alternativamente, las cadenas pesada y ligera por ejemplo se pueden recuperar y reconstituir en forma separada en una molécula de unión activa después de replegado *in vitro*. Los métodos de reconstitución se conocen bien en la técnica; Ejemplos de los métodos se proporcionan en particular en el documento EP 120 674 o en el documento EP 125 023.

Por lo tanto un proceso también puede comprender

(i) cultivar un primer organismo que se transforma con una primera construcción de ADN que codifica una molécula de unión de la invención y recuperar una primera molécula de unión del cultivo, y

(ii) cultivar un segundo organismo que se transforma con una segunda construcción de ADN que codifica una molécula de unión de la invención y recuperar una segunda molécula de unión del cultivo, y

(iii) reconstituir *in vitro* una molécula de unión activa de la invención de la primera molécula de unión obtenida en (i) y la segunda molécula de unión obtenida en (ii).

Si se necesita, se pueden producir más organismos o células, hasta tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho, y se utilizan para proporcionar más moléculas de unión.

De una forma similar, también se proporciona un proceso para producir una molécula de unión de dominio único o cadena sencilla de la invención que comprende (i) cultivar un organismo que se transforma con una construcción de ADN que codifica una molécula de unión de dominio único o cadena sencilla de la invención, respectivamente, y (ii) recuperar dicha molécula de cultivo.

Las moléculas de unión NogoA y NiG de la invención puede exhibir muy buena actividad de regeneración de nervio como se muestra, por ejemplo, en el modelo de crecimiento de neuritas de célula de gránulo, como se describe adelante.

#### 1. Ensayo de crecimiento de neuritas de célula de gránulo (*in vitro*)

Se toma tejido cerebral (corteza y tallo cerebral) y para cada ensayo se prepara frescamente extracto de proteína como se describió previamente (Spillmann et al. 1998, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220), J Biol Chem. 1998 Jul 24; 273(30):19283-93). En resumen, se homogeniza una pieza de tejido congelado (por ejemplo 0.25g) en 3-4 Vol de 60mM Chaps - 20mM Tris pH 8.0-1mM EDTA con un bloqueador de Proteasa (10mg/ml de Aprotinina - 5mg/ml, Leupeptina - 1mg/ml de Pepstatina - 1mM PMSF) a 4° C. El homogenato se pone en un rotador a 4° C durante 30 min y se centrifuga a 100'000g durante 45 min a 4° C en un rotor TLA 100.3 (ultracentrífuga Beckman TL-100). A partir de sobrenadante, se determina la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro de absorción.

Las células de gránulo cerebelar se purifican de compendios de tripsina de tejido cerebelar de ratas de 5-7 días postnatales como se describió previamente (Niederost et al 1999, Bovine SNC myelin containing neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans, J Neurosci. 1999 Oct 15; 19 (20):8979-89). Las moléculas de unión de la invención luego se preincuban durante 30 min en el sustrato de prueba y se retiran antes que se agreguen las células. Las células de gránulo cerebelar se agregan y se incuban durante 24 horas. Para detener el experimento, se agrega lentamente 2 ml de 4 % de formaldehído regulado a los platos de cultivo. El extracto de proteína de membrana cerebral de mono preparado como se describió anteriormente se absorbe durante la noche a 15mg de proteína por cm<sup>2</sup> de plato de cultivo en platos de 4 pozos Greiner (Greiner, Nuertingen, Alemania). Los platos se lavan tres veces con solución de Hank caliente antes de poner en placas las neuronas. Se preparan células de gránulo cerebelar de rata (5-7) día postnatal como se describió anteriormente y se ponen en placas de 50,000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivan durante 24 hr en medio libre de suero, se fijan, y se inmunotiñen con marcador de neuritas MAB 1b (Chemicon monoclonal Ab, 1:200). Para la tinción de los cuerpos celular DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato, de Molecular Probes) se utiliza después de tinción con

MAB1b. Para experimentos de anticuerpo, los mAb anti- Nogo-A o el IgG Ab de control se preincuban en los platos durante 30 min y posteriormente se retiran.

5 Se toman muestras aleatorias de cuatro campos a una distancia definida al borde del pozo para cada pozo utilizando un objetivo 40 X mediante el conteo de todas las intersecciones de neuritas con una estirpe puesta a través del centro del campo de observación. Todos los cuerpos celulares que tocan la estirpe también se cuentan, y se calcula una relación de índice de neuritas por cuerpo celular para cada pozo como se reportó previamente (Simonen et al, 2003, Neuron 38,201-211). Todos los conteos se hacen en ciego en experimentos codificados y se expresan como un índice de neuritas por cuerpo celular. Los resultados se expresan como neuritas de índice medio /cuerpo celular.

10 Se puede observar la mejora de crecimiento de neurita de la célula de gránulo cerebelar en el ambiente no permisivo del extracto de médula espinal preparado anteriormente mediante preincubación con una molécula de unión de la invención.

La actividad neutralizante de las moléculas de la invención también se puede estimar al medir la germinación regenerativa y el crecimiento de neurita y la recuperación funcional en los modelos de lesión de médula espinal in vivo brevemente descritos adelante.

## 15 2. Modelos de lesión de médula espinal en ratas y monos (in vivo)

Se lesionan ratas Lewis adultas microquirúrgicamente mediante transección de la mitad dorsal de la médula espinal bilateralmente en el nivel de la octava vertebra torácica. La laminectomía, anestesia y cirugía se describen en Schnell and Schwab 1993 (Eur. J. Neurosci. 5: 1156 - 1171). Trazado neuroanatómico: El tracto corticoespinal motor y sensor se traza al inyectar la amina de dextrano de biotina de trazador anterogrado (BDA) en la corteza del lado opuesto a la bomba o al injerto. El BDA se transporta a la médula espinal dentro de 10 - 14 días y se visualiza utilizando diaminobenzidina (DAB) como un sustrato como se describe en Brösamle et al., (2000 J. Neurosci. 20: 8061-8068).

25 Dos semanas después una lesión de la médula espinal que destruyó aproximadamente 40 % del segmento de médula espinal T8, principalmente en la mitad dorsal, que incluye ambas transecciones de médula espinal cervical principales (CST): trazado del CST en animales de control muestra un grado moderado de germinación reactiva del tracto. Este fenómeno corresponde a la germinación espontánea en respuesta a la lesión bien conocida en la literatura. Las ratas lesionadas se tratan con las moléculas de unión de la invención o con bombas que suministran las moléculas de unión de la invención que pueden mostrar germinación mejorada en el sitio de lesión y regeneración del crecimiento de axones de neuritas dañados de las neuritas dañadas. Más aún los animales pueden 30 mostrar la recuperación mejorada de las funciones sensor-motoras. Se describieron previamente dichas pruebas funcionales (Merkler et al, 2001, J. Neuroscience 21,3665-73).

## 3. Distribución de Tejido de Anticuerpos en el SNC de Mono Adulto

35 La moléculas de unión de la invención se purifican como IgG y se concentran en 3 mg/ml en PBS. El suero de ratón derivado de IgG (Chemicon Int., Temecula/CA, USA) o un mAb dirigido contra auxina de trigo (AMS Biotechnology, Oxon/UK) se utilizan como tratamientos de control. Se utilizan dos monos macacos adulto machos (Macaca fascicularis) en este estudio para infusión intratecal.

### Procedimientos quirúrgicos

40 Se induce anestesia mediante inyección intramuscular de cetamina (Ketalar(r); Parke-Davis, 5 mg/kg, i.m.). Se inyecta atropina i.m. (0.05 mg/kg) para reducir las secreciones bronquiales. Se pone un catéter intravenoso en la vena femoral para perfusión continua con una mezcla de propofol 1% (Fresenius (r)) y solución de glucosa al 4% (1 volumen de Propofol y 2 volúmenes de solución de glucosa), que induce una anestesia más profunda. El animal luego se pone en una estructura estereotáxica. Bajo condiciones estériles, se realiza una incisión de piel en la línea media vertical de C2 a Th1. Se exponen el corte fascia y los procesos espinales de C2 a Th1. Los músculos paravertebrales se retraen y se cortan las láminas de C6, C7 y Th1. Luego se realizan una laminectomía completa 45 C6 y una hemilaminectomía superior C7. La materia dura se expone y se corta longitudinalmente por encima del séptimo y octavo segmentos espinales cervicales, que corresponde a la zona rostral de la porción espinal cubierta por la sexta lámina cervical. Un tubo de polietileno (10 cm de largo), conectado a una bomba osmótica (Alzet(r), 2ML1; flujo: 50mg/hr) que suministra el anticuerpo hNogo-A, se inserta por debajo la dura y se empuja unos pocos milímetros en forma rostral y se une a la dura con una sutura. La bomba osmótica se pone y se asegura en una 50 cavidad hecha en la masa de los músculos de la espalda unos pocos centímetros menos que la laminectomía, en el lado izquierdo. El tubo se asegura a lo largo de su trayectoria con suturas al tejido de músculo. Los músculos y la piel se suturan y el animal se recupera de la anestesia usualmente 15-30 minutos después de la interrupción de la perfusión venosa con propofol. El animal se trata post-operatoriamente con un antibiótico (Ampicilina 10%, 30 mg/kg, s.c.). Se dan dosis adicionales de Carprofen diariamente durante una semana.

Los monos se sacrifican 8 días después del implante de la bomba osmótica. La sedación primero se induce con cetamina, como se mencionó anteriormente, seguido por una anestesia profunda obtenida mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de una dosis letal de pentobarbital (90 mg/kg). Los animales se someten a perfusión transcárdialmente con 0.4 litros de 0.9% de solución salina, seguido por 4 litros de fijador (4% de solución de paraformaldehído en regulador de fosfato 0.1 M, pH= 7.6). Se continúa la perfusión con 3 soluciones de sacarosa para aumentar la concentración (10% en fijador, 20 y 30 % en regulador de fosfato).

Procedimientos histológicos, inmuno-fluorescencia e histoquímica

Los cerebros y médulas espinales de los monos se cortan cuidadosamente, se crio-protegen en 30% de sacarosa y se seccionan a 40 mm en un criostato. Para la detección de los mAB infundidos se utiliza un anticuerpo secundario anti-humano (Jackson Laboratories). Para marcado doble, se pueden utilizar los siguientes anticuerpos: el AS472 de conejo (purificado por afinidad) para Nogo-A endógenos (Chen, 2000), los anticuerpos de conejo contra GFAP para los astrocitos, y un anticuerpo de conejo contra Catepsina D (DAKO) para ubicación lisosomal. Todos los anticuerpos se visualizan por TRITC o FITC acoplados que corresponden a los anticuerpos secundarios, o utilizando el sistema ABC-DAB (Vector). Las secciones se analizan mediante epifluorescencia en un Axiophot Zeiss o mediante microscopía confocal (ZEISS LSM 410).

Se analizan las médulas espinales en el sitio de infusión y en 6 cm en el caudal de las mismas. Están presentes altos niveles de moléculas de unión de la invención en el sitio de infusión. En la médula espinal más caudal, el canal central y la superficie de la médula se marcan fuertemente, mientras que la materia gris y blanca muestra una marca más homogénea, que, sin embargo, es específica y clara sobre el fondo. Una situación similar está presente en el prosencéfalo con marca fuerte de la superficie o ventrículos y buena penetración del anticuerpo Nogo-A en la parenquima.

Estos experimentos muestran que la infusión intratecal espinal de los anticuerpos contra un antígeno de superficie celular del SNC conduce a una buena distribución de las moléculas de unión y anticuerpos de la invención a través de la circulación de CSF en los espacios de licor interno (ventrículos, canal central) y externo. Los anticuerpos IgG penetran bien en el cerebro y el tejido de la médula espinal. Aunque el anticuerpo IgG de control negativo se lava rápidamente, el anticuerpo contra Nogo-A se retiene en el tejido de médula espinal y cerebro.

#### 4. Pruebas para reparación del nervio y mejora funcional en las lesiones espinales en monos

Se induce anestesia mediante inyección intramuscular de cetamina (Ketalar(r); Parke-Davis, 5 mg/kg, i.m.). Se inyecta atropina i.m. (0.05 mg/kg) para reducir las secreciones bronquiales. Se pone un catéter intravenoso en la vena femoral para perfusión continua con una mezcla de propofol 1% (Fresenius (r)) y solución de glucosa al 4% (1 volumen de Propofol y 2 volúmenes de solución de glucosa), que induce una anestesia más profunda. El animal luego se pone en una estructura estereotáxica. Bajo condiciones estériles, se realiza una incisión en la piel en la línea media vertical de C2 a Th1. El corte fascia y los procesos espinales de C2 a Th1 se exponen. Los músculos paravertebrales se retraen y se cortan las láminas de C6, C7 y Th1. Luego se realiza una laminectomía completa C6 y una hemilaminectomía C7 superior. Con el fin de suministrar las moléculas en proximidad cercana a la lesión, la punta libre de un tubo de polietileno unido a la bomba se fija bajo la dura unos pocos milímetros en forma rostral a la lesión.

Se pueden realizar pruebas manuales de destreza de comportamiento de acuerdo con el procedimiento publicado.

Se entrena la destreza manual al poner el mono sentado en una silla para primates en la parte frontal de un Perspex modificado "tablero Brinkman" (10 cm x 20 cm) que contiene 50 agujeros distribuidos aleatoriamente; 25 agujeros se orientan horizontalmente y 25 verticalmente {Liu, 1999 15428 /id; Rouiller, 1998 13239 /id}. 2.7. La regeneración y germinación de las fibras se pueden evaluar cómo se describe. El trazador anterogrado inyectado en el hemisferio derecho es Amina de Dextrano Biotinilado (BDA, Molecular Probe(r), 10% en solución salina). En el hemisferio izquierdo, se inyecta el Dextrano de Fluoresceína de trazador de anterogrado fluorescente (Molecular Probe (r), 10% en solución salina). El procesamiento histológico para visualizar los trazadores se puede realizar como se describe en detalle previamente {Rouiller, 1994 8322 /id}.

Por lo tanto la invención también proporciona:

(i) el uso de las moléculas de unión Nogo y NiG de la invención en la reparación del nervio del sistema nervioso de un mamífero, en particular, el sistema nervioso de un humano,

(ii) un método para reparar los nervios del sistema nervioso de un mamífero, en particular, el sistema nervioso de un humano, que comprende administrar una cantidad efectiva de las moléculas de unión Nogo y NiG de la invención a un paciente en necesidad de dicho tratamiento, o

(iii) una composición farmacéutica para la reparación del nervio del sistema nervioso de un mamífero, en particular, el sistema nervioso de un humano, que comprende las moléculas de unión de la invención y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión o sistema, y una célula anfitriona de acuerdo con la presente invención para uso como un medicamento. En particular dicha molécula de unión, polinucleótido, un vector de expresión o sistema o célula anfitriona se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC) o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC).

10 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión o sistema o una célula anfitriona de acuerdo con la presente invención en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. También proporciona productos que contienen dicha molécula de unión, polinucleótido, vector de expresión o sistema o dicha célula anfitriona, o un derivado farmacológicamente aceptable del mismo, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC).

15 También se prevé un método para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) y/o central (SNC) que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad efectiva de una molécula de unión, un polinucleótido, un vector de expresión o sistema o una célula anfitriona de la presente invención.

20 La presente invención indica adicionalmente en los ejemplos que las composiciones farmacológicas y los productos se pueden utilizar para liberación lenta de la molécula de unión y/o para depósito local de la molécula de unión en el sitio de la lesión.

25 Como se utiliza aquí, el término "liberación lenta" o los términos equivalentes "liberación controlada" o "liberación extendida" se refiere a formulaciones de fármaco que liberan un fármaco activo, tal como un fármaco de polipéptido, que incluye una molécula de unión NogoA o NiG de la invención, tal como un anticuerpo dirigido a NogoA o NiG, durante un periodo luego de la administración a un individuo. La liberación extendida de los fármacos de polipéptido, que puede ocurrir sobre un rango de tiempos, por ejemplo, minutos, horas, días, semanas o más, dependiendo de la formulación del fármaco, está en contraste con formulaciones estándar en las que sustancialmente la unidad de dosificación completa está disponible para la absorción inmediata o distribución inmediata por medio del torrente sanguíneo. Las formulaciones de liberación extendida preferidas resultan en un nivel para hacer circular el fármaco de una administración única que es sostenida, por ejemplo, durante 8 horas o más, 12 horas o más, 24 horas o más, 36 horas o más, 48 horas o más, 60 horas o más, 72 horas o más 84 horas o más, 96 horas o más, o incluso, por ejemplo, durante 1 semana o 2 semanas o más, por ejemplo, 1 mes o más. Las formulaciones de liberación extendida se describen bien en la técnica y se pueden seleccionar de acuerdo con el perfil de liberación anticuerpo preferido. Los polímeros adecuados incluyen materiales biodegradables y no biodegradables tal como ácido poliláctico glicólico (PLGA).

35 Como se utiliza aquí, el término "epítipo" se refiere a una unidad de estructura unida convencionalmente por un par de inmunoglobulina VH/VL. Los epítipos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo, y así representa el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio único, un epítipo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable único en aislamiento.

40 Como se utiliza aquí, el término "neutralizante," cuando se utiliza en referencia a la molécula de unión NogoA o NiG como se describe aquí, significa que la molécula de unión interfiere con una actividad o función medible de NogoA o NiG. Una molécula de unión NogoA o NiG es un polipéptido "neutralizante" si reduce una actividad o función medible del antígeno objetivo, por ejemplo Nogo o NiG, mediante por lo menos 50 %, y preferiblemente por lo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, de hasta y que incluye 100% de inhibición. Esta reducción de una actividad o función medible del antígeno objetivo se puede evaluar por un experto en la técnica utilizando métodos estándar para medir uno o más indicadores de dicha actividad o función. Como un ejemplo, cuando el objetivo es Nogo o NiG, se puede evaluar la actividad neutralizante utilizando un ensayo de crecimiento de Neurita descrito adelante.

50 En particular, las moléculas de unión de la invención son útiles para la regeneración axonal y germinación mejorada después del daño de fibra de nervio. Sin embargo, las moléculas de la invención tienen amplia utilidad en particular para sujetos humanos. Por ejemplo, la molécula de unión de la invención es útil en el tratamiento de diversas enfermedades del sistema nervioso periférico (SNP) y central (SNC), es decir más particularmente en enfermedades neurodegenerativas tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Esclerosis amiotrófica lateral (ALS), patologías como Lewy u otra demencia en general, enfermedades luego de trauma craneal, cerebral o espinal, apoplejía o una enfermedad desmielinizante. Dichas enfermedades desmielinizantes incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, desmielinización monofásica, encefalomielitis, leucoencefalopatía multifocal, panencefalitis, enfermedad de Marchiafava-Bignami, mielomielosis pontine, adrenoleucodistrofia, enfermedad de

Pelizaeus-Merzbacher, Degeneración esponjosa, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, leucodistrofia metacromática y enfermedad de Krabbe. En un ejemplo, la administración de las moléculas de unión de la invención se puede utilizar para tratar una enfermedad desmielinizante asociada con la proteína NogoA.

5 En otro ejemplo, las células que expresan las moléculas de unión de la invención se pueden trasplantar a un sitio de lesión de la médula espinal para facilitar el crecimiento axonal a través del sitio de la lesión. Dichas células trasplantadas proporcionarían medios para restaurar la función de la médula espinal luego de lesión o trauma. Dichas células pueden incluir células olfatorias envoltentes y mastocitos de diferentes linajes de nervio fetal o injertos de tejido.

10 Adicionalmente, la moléculas de unión de la invención son útiles para el tratamiento de trastornos oculares degenerativos que pueden implicar directa o indirectamente la degeneración de células retinales o de córnea que incluye retinopatías isquémicas en general, neuropatía óptica isquémica anterior, todas las formas de neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, edema macular quístico (CME), retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt, degeneración retinal viteliforme de Best, amaurosis congénita de Leber y otras degeneraciones retinales hereditarias, miopía patológica, retinopatía del prematuro, y neuropatía óptica hereditaria de Leber, los efectos posteriores de trasplante de córnea o de cirugía de córnea refractiva, y queratitis por herpes.

15 Adicionalmente, la moléculas de unión de la invención son útiles para el tratamiento de afecciones psiquiátricas, particularmente esquizofrenia y depresión.

20 Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo de, por ejemplo, la molécula particular de la invención que se va a emplear, el modo de administración y la naturaleza y severidad de la afección que se va a tratar. En general, la dosificación preferiblemente estará en el rango de 1 mg/kg/día a 1 mg/kg/día.

25 La moléculas de unión de la invención se administran convenientemente mediante bombas o se inyectan como agentes terapéuticos en el sitio lesionado, por ejemplo se pueden administrar directamente en el SNC intracranialmente o en la espina intratecalmente al sitio lesionado. El espacio lleno con fluido alrededor de la médula espinal se denomina el espacio subaracnoide o intratecal. El fluido cerebroespinal (CSF) fluye a través de esta área, bañando y protegiendo el cerebro y la médula espinal. Una bomba de fármaco intratecal puede funcionar más eficientemente que la medicación oral debido a que suministra medicina directamente en el CSF, al derivar la ruta que la medicación oral toma a través del cuerpo. Por lo tanto en una realización preferida, la administración se hace a través de la administración intratecal, por ejemplo utilizando un catéter externalizado conectado a una bomba portátil. En una realización preferida adicional, se utiliza inyección de bolo intratecal. Los medios y métodos adecuados para administración intratecal de fármacos son aquellos conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de bombas son: la bomba Alzet® y los sistemas de infusión Medtronic SynchroMed® o Isomed®. La moléculas de unión se pueden infundir continuamente, o se pueden administrar preferiblemente como dosis fijas en intervalos de tiempo específicos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21, o 30 días, por ejemplo mediante inyecciones de bolo directas en el fluido cerebroespinal.

35 Las moléculas de unión de la invención se pueden proporcionar solas, o en combinación, o en combinación secuencial con otros agentes. Por ejemplo, las moléculas de unión de la invención se pueden administrar en combinación con agentes anti-inflamatorios tal como pero no limitado a corticosteroides luego de apoplejía o lesión de la médula espinal como un medio para bloquear el daño neuronal adicional y la inhibición de la regeneración axonal, los factores neurotróficos tal como factor de crecimiento del nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o otros fármacos para enfermedades neurodegenerativas tal como Exelon(tm) (Rivastigmina) o Levodopa (L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina)). Otros patrones de combinación adecuados para el tratamiento de apoplejía son Alteplasa y Desmoteplasa (DSPA, por ejemplo descrito en el documento WO90/09438). En una realización, la presente invención proporciona una combinación que comprende una molécula de unión de la invención y Desmoteplasa, en particular para el tratamiento de apoplejía así como también composiciones farmacéuticas que comprenden dicha combinación. Como se utiliza aquí, se dice que dos agentes se administran en combinación cuando los dos agentes se administran simultáneamente o se administran independientemente en una forma de tal manera que los agentes actuarán al mismo tiempo.

50 La estructura de los ingredientes activos identificados por números de código, pueden tomar nombres genéricos o comerciales de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de las bases de datos, por ejemplo Patentes Internacionales (por ejemplo Publicaciones Mundiales IMS) u otras bases de datos proporcionadas por IMS Health. Cualquier experto en la técnica es completamente capaz de identificar los ingredientes activos y, con base en estas referencias, de forma similar permite fabricar y probar las indicaciones y propiedades farmacéuticas en los modelos de prueba estándar, ambos in vitro e in vivo.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar en una forma convencional. Por ejemplo una composición de acuerdo con la invención que comprende las moléculas de la invención se proporciona

preferiblemente en forma liofilizada. Para la administración inmediata se disuelve en un portador acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica regulada estéril.

5 Para ayudar a elaborar las composiciones adecuadas, las moléculas de unión de la invención y opcionalmente un segundo fármaco que mejora el efecto de las moléculas de unión de la invención, se pueden empaquetar en forma separada dentro del mismo contenedor, con instrucciones para mezcla o administración concomitante. Se proporcionaron anteriormente candidatos de segundo fármaco opcionales.

El efecto sinérgico de una combinación de las moléculas de unión de la invención y los factores de crecimiento tal como NGF se puede demostrar in vivo mediante los modelos de lesión de médula espinal.

10 La presente invención también se relaciona con el uso de la composición farmacéutica de la invención para la preparación del medicamento de liberación lenta de la molécula de unión de la invención.

La presente invención también se relaciona con el uso de la composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento para el depósito local de la molécula de unión de la invención en el sitio de lesión.

15 La presente invención se relaciona adicionalmente con el agente farmacéutico de la invención para la liberación lenta de la molécula de unión de la invención y para el depósito local de la molécula de unión de la invención en el sitio de la lesión.

La presente invención también se relaciona con un método para la liberación lenta de una molécula de unión de la invención y para el depósito local de una molécula de unión de la invención.

La invención se entenderá más completamente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo estos no se deben constituir como limitantes del alcance de la invención.

20 En los siguientes ejemplos todas las temperaturas están en grados Celsius (° C).

25 Los anticuerpos monoclonales de atención en los Ejemplos son moléculas de unión de acuerdo con la presente invención que comprenden la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4 (6A3-IgG1), o que comprende la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 24 (6A3-IgG4).

Es evidente que en los párrafos dados anteriormente, el término "que comprende" abarca el término "que consiste de".

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

	ELISA	ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzima
30	FACS	clasificación de células activadas por fluorescencia
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
	FBS	suero bovino fetal
	FCS	suero de becerro fetal
	HCMV	promotor de citomegalovirus humano
35	IgG	isotipo G de inmunoglobulina
	mAb	anticuerpo monoclonal
	VH	región variable de la cadena pesada
	VL	región variable de la cadena ligera
	LC	cadena ligera

	HC	cadena pesada
	CDR	región determinante de complementariedad
	BSA	albúmina de suero bovina
	aa	aminoácidos
5	bp	pares base
	SNC	sistema nervioso central
	HRP	peroxidasa de rábano
	RT	temperatura ambiente
	PBS	solución salina regulada con fosfato
10	TBS	solución salina regulada con Tris
	CEA	antígeno carcinoembrionario
	IF	inmunofluorescencia
	IgG	inmunoglobulina G
	PBS-T	solución salina regulada con fosfato con 0.05% de Tween 20
15	PFA	Paraformaldehído

## EJEMPLOS

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes

### Ejemplo 1: Secuencia del anticuerpo monoclonal anti-hu-NogoA Medarex 6A3.

Se selecciona un anticuerpo monoclonal IgG1 humano con alta afinidad para el fragmento humano NiG humano de NogoA. Los monoclonales originales se secretan de los clones de células de hibridoma de ratón que se derivan mediante tecnología de hibridoma estándar utilizando "ratones Medarex"; ratones reconstituidos recombinantemente con genes de inmunoglobulina humanos, mediante Medarex Inc., Annandale, NJ. La generación de Ratones Medarex inmunizados con NiG humano, y la producción de hibridomas de los mismos, se conoce bien en la técnica; se han seguido condiciones similares a aquellas descritas en el documento WO 2005/028508. El nivel de producción de anticuerpo de la mayor parte de los hibridomas es muy bajo; por lo tanto se emplea tecnología de ADN recombinante para construir vectores de expresión especializados para producción a alto nivel del anticuerpo completo o el fragmento Fab en una estirpe celular. La generación de fragmentos Ab y Fab purificados de Abs se conoce bien y se describe en detalle en por ejemplo el documento WO 2005/028508. Se han seguido etapas similares para la generación del 6A3-mAb y 6A3-Fab purificado. Los cADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 6A3-IgG1 se amplifican mediante PCR (reacción de cadena polimerasa) de mRNA de hibridoma, se clonan y se caracterizan mediante secuenciamiento (Figuras 1 y 2; SEQ ID NO 7 y 6).

### Ejemplo 2: Generación de Fab y IgG4.

El 6A3 mAb es del isotipo IgG1. Los anticuerpos de isotipo IgG1 humanos tienen una alta afinidad para los receptores Fc celulares y pueden inducir toxicidad celular dependiente de anticuerpo (AADC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Jerries et al., 2002, Hezareh et al., 2001). Más aún, se han reportado los mAb IgG para el flujo de salida rápidamente del cerebro a la sangre a través de la barrera de cerebro-sangre por medio de transcitosis inversa mediada por el receptor Fc (Zhang et al., 2001). Con el fin de retirar las interacciones mediadas por el receptor Fc potencial del 6A3 IgG1 mAb, su isotipo se ha intercalado recombinantemente a un IgG4 y también para la producción recombinante de un fragmento monovalente Fab para expresión de alta capacidad en células SP2/0 y E. coli.

El secuenciamiento de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de este anticuerpo anti-Nogo-A humano permite la producción recombinante del fragmento 6A3-Fab y el anticuerpo de isotipo 6A3-IgG4 en estirpes celulares productoras de alta capacidad.

5 Para la expresión de E. coli del fragmento Fab, ambos cADN (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 6) se clonan pASK116. El plásmido utilizado para clonar los cADN que proporciona los genes de dominio constante de IgG1/k de ratón (Skerra, 1994). Las dos cadenas de polipéptidos del fragmento de anticuerpo se codifican en un operón bajo el control transcripcional del promotor tetraciclina. El primer cistrón codifica la unidad estructural de cadena pesada del fragmento Fab. El dominio VH se fusiona al péptido de señal OmpA en su terminal N y en el dominio CH1 del IgG1 de clase de murino en su extremo de terminal C. El segundo cistrón codifica la cadena ligera con el dominio VL fusionado al péptido líder PhoA y el dominio de murino CH1. Luego de la inducción de la expresión de las dos cadenas del fragmento Fab se llega a secretar simultáneamente en el periplasma de E. coli en donde la proteína se pliega, ocurre la formación de enlace de disulfuro y ensamble de cadena. Para la expresión del Fab en E.coli los plásmidos se transfieren a BMP para producción a gran escala.

15 Para la clonación de la región variable de cadena pesada y variable del anticuerpo 6A3 para expresión como un anticuerpo IgG4 en células SP2/0, los cADN correspondientes se clonan en el plásmido LCvec-AAL160 y hcMCPfin. Para la expresión del anticuerpo IgG4 completo, los plásmidos se linearizan con NotI para la construcción LC y PvuI para la construcción HC y se transfectan en células SP2/0.

20 El fragmento monovalente 6A3 IgG4 y 6A3 con su etiqueta his se han producido y purificado exitosamente. Los anticuerpos recombinantes exhiben altas afinidades para el fragmento humano NogoA hNiG en Experimentos BIAcore (véase adelante). Los valores Kd respectivos son 0.14 nM y 1.1 nM confirmando la clonación exitosa y correcta y expresión recombinante del Ab retiene su afinidad para el fragmento NogoA hNiG humano.

Las regiones codificantes y las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de 6A3-Ig4 se muestran en las Figuras 3 y 4 (SEQ ID NOs 24, 25, 28 y 28).

### Ejemplo 3: Determinación de las regiones determinantes de complementariedad del 6A3-Ab.

25 Las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera y pesada variable del anticuerpo 6A3 se determinan utilizando la base de datos Kabat en el URL de [www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/). La definición Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia y es el método más comúnmente utilizado para determinar los CDR de las regiones variables de anticuerpo (Wu TT, Kabat EA, 1970).

30 Todas las 6 definiciones CDR se correlacionan bien las secuencias de aminoácidos experimentalmente determinadas excepto para CDR-H2, en donde se encuentran los residuos típicos antes del CDR que deben ser LEWIG, LEWVA (Figura 5). Sin embargo son posibles una serie de variaciones para CDR-H2.

### Ejemplo 4: Mediciones de afinidad de biosensor para 6A3-IgG1, 6A3-IgG4 y 6A3 Fab de ratón a NiG.

35 La afinidad de 6A3-IgG1 mAb, 6A3-IgG4 mAb de ratón, y del 6A3 Fab se miden mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando un biosensor óptico BIAcore 2000 (Biacore, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El NiG humano recombinante se inmoviliza covalentemente en una célula de flujo de un chip sensor CM5 utilizando química de acoplamiento de amina. En resumen, se activa la matriz de dextrano carboximetilado al inyectar 35 ml de una solución que contiene 0.025M NHS y 0.1M EDC. Para la inmovilización en el chip sensor, el NiG humano recombinante se diluye en regulador de citrato 0.01M a pH 4 y se inyecta a un índice de flujo de 5ml/min para lograr niveles de acoplamiento que permiten mediciones de afinidad. La desactivación del grupo éster NHS restante se realiza mediante la inyección de 35ml de clorhidrato de etanolamina 1M (pH 8.5). Se regenera la superficie del chip sensor al inyectar 5ml 0.1M HCl. Para la medición de la afinidad, los anticuerpos se inyectan en diferentes concentraciones, que varían de 0.50nM a 100nM a un índice de flujo de 200 ml/min. Después de cada inyección, se regenera la superficie del chip sensor con la inyección de 10 ml de 0.1M HCl sin pérdida de actividad de unión en la superficie. Las constantes cinéticas, ka y kd y las constantes de afinidad KA y KD se evalúan utilizando el software BIAevaluations 3.0 suministrado por el fabricante.

50 Medición de afinidad en BIAcore: Las constantes de unión de afinidad y cinéticas del 6A3-IgG1 mAb, 6A3-IgG4 mAb de ratón, y del fragmento Fab monovalente derivado de 6A3 al NogoA humano recombinante se miden en tiempo real utilizando tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) (Biacore). Para este análisis el NiG humano recombinante se acopla en una superficie de chip sensor y se inyectan diferentes concentraciones de los anticuerpos. Los parámetros cinéticos de las interacciones de unión se derivan de los sensogramas mediante ajuste de curva no lineal. Estas constantes de afinidad en equilibrio al NiG humano para los anticuerpos están en el rango de KD 0.13nM a 2.5 nM para 6A3-IgG4, 6A3-IgG1, 6A3 Fab.

**Ejemplo 5:** Unión de anticuerpos anti-NogoA NVP-6A3-Ab-NX-1 y NVP-IIC7-NX-1 al NogoA endógeno humano.

En este ejemplo se muestra la unión de los anticuerpos al Nogo-A humano endógeno. Para este fin, se han caracterizado dos estirpes celulares humanas previamente para mostrar la expresión génica específica oligodendrítica de Nogo-A, y posteriormente se prueban para la unión específica de los anticuerpos. Las estirpes celulares oligodendrogliales humanas MO3.13 y HOG se utilizan para caracterizar nuestros dos anticuerpos anti-Nogo-A NVP-6A3-Ab-NX-1 (6A3-Ab) y NVP-IIC7Ab-NX-1 (IIC7- Ab) con respecto a su unión al Nogo-A endógeno. Las células se pueden utilizar adicionalmente para realizar un bioensayo para la caracterización de las diferentes tandas de anticuerpo para ensayos clínicos. En dos configuraciones experimentales independientes, se analiza y detecta la unión de 6A3-Ab al Nogo-A humano endógeno en aquellas células.

En una primera etapa las células MO3:13 se analizan para la presencia de mRNA Nogo-A mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para el Nogo-A humano. En segundo lugar, la unión de ambos anticuerpos al Nogo-A endógeno se muestra mediante inmunosupresión de los lisados celulares MO3.13 e inmunodetección. Finalmente, la tinción inmunofluorescente específica de las células MO3.13 y HOG con el 6A3-Ab confirma los resultados de las inmunoprecipitaciones.

Sin embargo, se encuentra que 6A3-AB y 11C7-Ab son capaces de unirse específicamente al Nogo-A humano endógeno.

**Métodos**

Estirpes celulares: Se obtienen células MO3.13 del Dr. N. Cashman, University of Toronto. Estas se originan de la fusión de un mutante resistente a 6-tioguanina del rhabdomyosarcoma humano (RD) con oligodendrocitos humanos de adulto cultivados de espécimen quirúrgico. Las células HOG se obtienen de Dr. G. Dawson, University of Chicago. Esta estirpe celular se establece de oligodendroglioma retirado quirúrgicamente. Todas las células se cultivan en Medio Eagle Modificado de Dulbecco con alta glucosa (Gibco) complementada con Glutamax, 10 % de suero bovino fetal y Penicilina/Estreptomycin.

RT-PCR: Se prepara ARN total de  $5 \times 10^5$  células MO3.13 utilizando reactivos Tripure (Roche Diagnostics). Después de tratamiento de DNasa, se transcribe a la inversa 1 mg de ARN en un volumen total de 20 ml utilizando Omniscript RT (Qiagen) y un cebador oligo dT. Los cebadores utilizados para PCR son específicos para Nogo-A, amplificando un fragmento 194 bp partiendo de la posición bp 1197 en un Nogo-A humano de longitud completa (5'-TGAGGGAAGTAGGGATGTGC-3' (SEQ ID NO: 32), 5'-CAGGTGATGTACGCTCTGGA- 3' (SEQ ID NO: 33)). Se establece una reacción utilizando 2ml de cADN (o 0.1mg ARN -RT), 5ml de regulador 10x, 3ml de dNTP (5mM cada uno), 2.5 ml de cebador 5' (10mM), 2.5 ml de Cebador 3' (10 mM), 0.5 ml de polimerasa de HotStar-Taq (Qiagen) y 34.5 ml de H<sub>2</sub>O. Se utilizan los siguientes ciclos PCR: 95° C 15 min., (94° C 30 seg., 55° C 30 seg., 72° C 15 seg.) x 35, 72° C 10min. -->4°C. Después de la terminación de PCR, se analiza una alícuota de 10ml en un gel de agarosa de bromuro de etidio al 2%.

Inmunoprecipitación e Inmunodetección: Para cada IP un plato de cultivo de 10cm de células MO3.13 que se cultivan en confluencia se lava con PBS y las células se lisan en 500 ml de Reactivo de Extracción de Proteína de Mamífero M-PER (Pierce) que contiene cóctel de inhibidor de proteasa completo (Roche Diagnostics). La fracción soluble de lisado se pre-limpia con Proteína G-Sefarosa (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente (temperatura ambiente). Para pre-limpieza se agrega sobrenadante fresco de Proteína G-Sefarosa y el anticuerpo correspondiente (50 nM concentración final) y se incuba a 4° C durante 4 horas en un agitador de rotación. Los anticuerpos son 6A3 IgG4, 11C7 IgG1 o anti-CEA IgG4 contra una proteína no relacionada (antígeno carcinoembrionario), que sirve como un control negativo. Una alícuota de cada sobrenadante se mantiene para análisis de la fracción no unida; la Sefarosa se lava 4 veces con regulador TNS (10mM TrisHCl pH 7.8, 1% (p/v) de N-Laurilsarcosina, 100mM NaCl), una vez con PBS, y la fracción unida a sefarosa se eluye con 20 ml de regulador de carga SDS-PAGE (Invitrogen). Las muestras se calientan a 95° C durante 5 minutos y una 10ml de alícuota cada una se hace correr en gel de gradiente de 4-12% NuPage (Invitrogen) en regulador MES. Las proteínas se transfieren en una membrana de celulosa durante 4 horas a 30 V y se analizan para transferencia con tinción Ponceau. Después de transferencia, la membrana se bloquea durante la noche a 4° C en reactivo de bloqueo western (Roche Diagnostics) en PBS-T. Para inmunodetección, la membrana se incuba con el anticuerpo 6A3-IgG4 en concentración 1nM durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente con una peroxidasa anti-humana acoplada al anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectan señales utilizando ECL-Advance (Amersham) y se exponen a la película durante 1 minuto.

Inmunofluorescencia: Se colocan en placas células MO3.13 y HOG en portaobjetos de cámara de tejido recubiertos con poli-D-lisina de 8 pozos (Becton Dickinson) y se cultivan hasta 80% de confluencia. Después de lavado en PBS, las células se fijan en 4% de PFA durante 30 min a temperatura ambiente. Se bloquea la unión no específica con 10% de FCS, 0.1% de Triton X-100 durante 20 min. Las células se incuban en 1% de FCS, 0.1% de Triton X-100 durante 1 hora con 6A3-IgG4 5nM o regulador solo como control negativo. Después de la incubación del anticuerpo,

las células se lavan 3 veces con PBS y se incuban con un anticuerpo IgG anti humano marcado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) en dilución 1:200 en PBS durante 1 hora.

#### Resultados

5 RT-PCR: RT-PCR utilizando el ARN MO3.13 como plantilla resulta en un fragmento de ADN distinto de aproximadamente 200 bp (Figura 6). No se detecta producto en los controles negativos (ARN sin transcripción inversa y H<sub>2</sub>O). Está presente un fragmento de PCR en el tamaño esperado de 194 bps; no se amplifican productos en las muestras de control negativas (ADNsa tratada con ARN y H<sub>2</sub>O).

10 Inmunoprecipitación: Después de inmunoprecipitación (IP) de los lisados celulares MO3.13 y la inmunodetección con el anticuerpo 6A3 anti Nogo-A (Figura 7) se detecta una banda fuerte única de tamaño esperado (190kDa) ambos para el anticuerpo 6A3- IgG4 (línea 4) y 11C7-IgG1 (línea 6). No se detecta señal después de IP con el anticuerpo de control anti-CEA contra una proteína no relacionada (antígeno carcinoembrionario) (línea 1) y en las fracciones no unidas (líneas 5 y 7). Una banda débil es visible en el lisado celular crudo MO3.13 IP (línea 2). Una señal débil no específica en un bajo peso molecular visto en la fracción de lisado celular insoluble (línea 3).

15 Inmunofluorescencia: La inmunofluorescencia por tinción de células permeabilizadas MO3.13 y células HOG con el anticuerpo secundario anti-humano marcado con 6A3-IgG4 y Alexa-Fluor 488 resulta en tinción muy brillante de las células (Figura 8a y 8b, parte izquierda), mientras no se detecta virtualmente señal con solo el anticuerpo secundario (parte derecha).

#### Discusión

20 El análisis RT-PCR de las células MO3.13 utilizando los cebadores específicos Nogo-A para PCR resultan en un fragmento de ADN de tamaño esperado (194 bp), mientras no se detecta producto PCR con la muestra de ARN transcrita no inversa o el control de agua. A partir de este resultado concluimos que las células expresan el Nogo-A endógeno.

25 La inmunoprecipitación de los lisados celulares MO3.13 y la inmunodetección con el anticuerpo anti-Nogo-A 6A3 muestra una banda Nogo-A única fuerte en el tamaño esperado (190kDa). En contraste, el anticuerpo de control anti-CEA (IgG4) no produce una banda de tamaño correspondiente. La diferencia en intensidad entre las bandas resulta de las inmunoprecipitaciones 6A3 y 11C7 se deben más probablemente a las diferentes afinidades de los diferentes isotipos de anticuerpo para Proteína G Sefarosa (afinidad 6A3 > afinidad 11C7). Los resultados de la tinción inmunofluorescente intracelular de las células MO3.13 y HOG que muestran que el 6A3-IgG4 se une al Nogo-A endógeno.

30 A partir de estos resultados se concluye que las dos estirpes celulares expresan endógenamente Nogo-A y que el anticuerpo 6A3 IgG4 (6A3-Ab) y el 11C7 IgG1 (11C7-Ab) se unen específicamente al Nogo-A humano endógeno. Estos hallazgos sugieren que la estirpe celular MO3.13 se puede utilizar para establecer ensayos de unión Nogo-A para, por ejemplo, la caracterización del anticuerpo.

35 **Ejemplo 6:** Efecto del tratamiento 6A3 en la recuperación funcional de monos Macacos sometidos a lesiones cerebrales.

40 En un estudio adicional, se someten monos macaco a una lesión como se describió previamente y se tratan con una infusión intratecal de 4 semanas de 6A3 o IgG de control desde el tiempo de lesión. Se determina la destreza manual para la mano izquierda afectada utilizando la prueba de tablero de Brinkmann modificada bajo condiciones como se describió aquí anteriormente. El tratamiento 6A3 mejora la velocidad y grado de recuperación funcional comparado con el tratamiento de control IgG. Cuando se determina el tamaño de la lesión al final del experimento, la recuperación funcional de monos tratados con IgG de control se encuentra que se correlaciona casi inversamente con el tamaño de la lesión, que varía de 90 % para una lesión del 50 % a 53 % para una lesión del 90 %. Por el contrario, la cantidad de recuperación en los animales tratados con mAb anti-Nogo-A no se afecta significativamente por el tamaño de la lesión y para animales tratados 6A3 que casi alcanza su desempeño pre-lesión cuando el tamaño de la lesión es tan alto como 85 %.

**Ejemplo 7:** Retención CSF y vida útil del anticuerpo 6A3 en sujetos humanos

La retención CSF y la vida útil del anticuerpo 6A3 en sujetos humanos se determinan después de infusiones CSF durante 14 días (dosis diaria 15 mg / día) y se miden las concentraciones individuales en suero y CSF (figuras 9 y 10).

Las concentraciones CSF permanecen constantes o declinan solo marginalmente, en los dos casos finalizando en los días 34 y 56, es decir aproximadamente 20 y 42 días después de final de la infusión, cuando se compara con los niveles medidos durante la infusión, que indica la residencia sorprendentemente larga y/o vida útil en el CSF de 6A3. Este comportamiento farmacocinético permitiría diferentes rutas de administración y regímenes de dosis con intervalos más largos. Serían factibles las inyecciones de bolo en el CSF durante intervalos de 2 o más días o semanas. El anticuerpo 6A3 también sería adecuado para formulaciones de liberación controlada, tal como formulación en polímeros e implantes biodegradables o no biodegradables.

#### **Ejemplo 8:** Eficacia en modelo SCI de macaco

Se someten 3 monos a una sección unilateral de la médula espinal en el límite C7/C8, una lesión conocida como para deshabilitar la generación de movimientos de dedos preciso fino, y se implanta con una bomba Alzet® osmótica que se suministra intratecalmente al sitio de la lesión de anticuerpo de ratón IgG en el animal de control o 6A3 anticuerpo en los animales tratados durante 4 semanas en una dosis de 1 mg/día (Figura 11 y Freund et al., Nat Med 12:7 90-2, 2006). Se evalúa la destreza manual mediante la recuperación del gránulo de alimento de ranuras verticales y horizontales en una prueba de tablero de Brinkman modificada. Otras tareas de comportamiento incluyen la recuperación del gránulo de alimento de un cajón, movimientos de brazo balístico, capacidad motora de la pata para agarrar los alimentos y observación del comportamiento en dolor e incomodidad. Las pruebas se realizan 60 días antes de la lesión hasta 120 días después de la lesión en intervalos regulares.

Los monos se someten a una sección de la médula espinal unilateral y se tratan intratecalmente con el anticuerpo de control de ratón IgG (n=2, es decir Cont. 1 con 50 % de lesión y Cont. 2 con 90% de lesión) o 6A3 (n=2, es decir ATI1 con 85 % de lesión y ATI2 con 80% de lesión) en una dosis de 1 mg/día durante 4 semanas (pesos del mono: Cont 1, 5.1 kg, Cont 2, 4.1 kg, ATI 1, 5.0 kg, ATI 2, 4.5 kg). Los resultados se muestran como el número total de gránulos durante las sesiones de prueba en los días específicos del ensayo. Se calculan los valores utilizando puntajes de comportamiento individuales pre-lesión y post-lesión cuando el nivel de desempeño permanece estable.

El tratamiento de anticuerpo 6A3 en los monos da una mejora gradual en la recuperación del gránulo de alimento utilizando la mano izquierda afectada de las ranuras horizontal y vertical en comparación con un mono tratado con IgG de control. El mono de control muestra un déficit persistente total en la recuperación de los gránulos de las ranuras horizontales, un movimiento que requiere mayor destreza manual que la recuperación de las ranuras verticales.

Después de la recuperación que ha alcanzado un nivel máximo en la prueba de tablero de Brinkmann, a los monos se les prueba su capacidad para agarrar la manija de un cajón con su mano izquierda afectada, para abrirlo y extraer un gránulo de alimento de un pozo en el cajón. El mono tratado con IgG de control con una lesión del 90% (Cont. 2) se incapacitó totalmente para agarrar la manija y abrir el cajón. El movimiento del brazo es más lento de lo normal y la forma de la mano es anormal. Esto se puede derivar de la línea con flecha doble, indicando una diferencia clara entre la actividad antes de la lesión y la actividad después de la lesión y el tratamiento con el anticuerpo IgG de control, que indica solo recuperación parcial. Los animales tratados con anticuerpo 6A3 con 85 % (ATI-1) o 80 % (ATI-2) de lesiones recuperan la capacidad de realizar la tarea rápida y efectivamente, independiente del tamaño de la lesión. No se presenta diferencia sustancial en la actividad antes y después de la lesión cuando se trata con el anticuerpo 6A3, apuntando a una recuperación completa debido al tratamiento con anticuerpo 6A3. El tratamiento con anticuerpo 6A3 así proporciona un efecto beneficioso claro en la recuperación después de lesiones cerebrales inducidas en Macacos, cuando se compara con el tratamiento con anticuerpo IgG de control.

#### **Ejemplo 9:** Ensayos clínicos

Se describe un estudio clínico adecuado como sigue:

El estudio tiene tres fases: Fase de Detección (que incluye Inicial), Fase de Tratamiento de marca abierta y por lo menos una Fase de Seguimiento de 22 semanas. El estudio se conduce bajo la supervisión de Un Tablero de Supervisión de Seguridad de Datos Independientes (DSMB).

Se involucró un total de 22 pacientes en 4 cohortes secuenciales, parcialmente superpuestos para recibir una infusión continua del anticuerpo 6A3. Todos los pacientes tienen un periodo de seguimiento durante por lo menos 22 semanas post infusión para evaluación de seguridad adicional.

La asignación del paciente y la dosis de tratamiento y duración por cohorte es como sigue:

- Cohorte 1: 3 pacientes parapléjicos reciben 5 mg [en 2.5 ml] durante 24h;
- Cohorte 2: 3 pacientes parapléjicos reciben 30 mg [en 2.5 ml] durante 24 h;

- Cohorte 3: 6 pacientes parapléjicos reciben hasta 30 mg/día [en 2.5 ml/día] durante 14 días.
- Cohorte 4: 10 pacientes para- y tetrapléjicos reciben hasta 30 mg/día [en 2.5 ml/día] durante 28 días.

5 Los pacientes se supervisan cercanamente durante un periodo de por lo menos seis meses luego del inicio de infusión. El estado de los pacientes se supervisa cercanamente mediante mediciones de los signos vitales, registros ECG (interpretación mediante una instalación central) y evaluaciones de laboratorio con base en matrices de sangre, orina y CSF. Los exámenes neurológicos utilizando la escala ASIA (Clasificación Neurológica Estándar Aplicable de Lesión de Médula Espinal por la Asociación Americana de Lesiones de Médula Espinal) (Ditunno, et al, 1994; American Spinal Cord Injury Association. Paraplegia 32(2): 7080.) se realizan por médicos calificados para evaluar la eficacia, pero también para evaluar la exacerbación potencial de la lesión de la médula espinal. Se realiza un total de 10 cuatro MRI cerebrales y espinales para cada paciente. Se toman muestras CSF en tres puntos de tiempo de cada paciente (pre-dosis, durante la fase de tratamiento y durante la fase de seguimiento) para análisis farmacocinético (PK). Las muestras de sangre también se obtienen para análisis PK a través de las fases de tratamiento y seguimiento. Los datos de todos los pacientes se revisan mediante el DSMB independiente por protocolo.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> NOVARTIS A.G. University of Zurich
- <120> Moléculas de unión a NOGO-A mejoradas y uso farmacéutico de las mismas
- <130> NIAG-006-PCT
- <150> 61/001,741
- <151> 2007-11-02
- 20 <150> EP07119847.7
- <151> 2007-11-02
- <160> 33
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 3919
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 30 <222> (1)..(3579)
- <223> NogoA Humano
- <400> 1

ES 2 425 768 T3

atg Met 1	gaa Glu	gac Asp	ctg Leu	gac Asp 5	cag Gln	tct Ser	cct Pro	ctg Leu	gtc Val 10	tcg Ser	tcc Ser	tcg Ser	gac Asp	agc Ser 15	cca Pro	48
ccc Pro	cgg Arg	ccg Pro	cag Gln 20	ccc Pro	gcg Ala	ttc Phe	aag Lys	tac Tyr 25	cag Gln	ttc Phe	gtg Val	agg Arg	gag Glu 30	ccc Pro	gag Glu	96
gac Asp	gag Glu 35	gag Glu	gaa Glu	gaa Glu	gag Glu	gag Glu	gag Glu 40	gaa Glu	gag Glu	gag Glu	gac Asp	gag Glu 45	gac Asp	gaa Glu	gac Asp	144
ctg Leu 50	gag Glu	gag Glu	ctg Leu	gag Glu	gtg Val 55	ctg Leu	gag Glu	agg Arg	aag Lys	ccc Pro	gcc Ala 60	gcc Ala	ggg Gly	ctg Leu	tcc Ser	192
gcg Ala 65	gcc Ala	cca Pro	gtg Val	ccc Pro 70	acc Thr	gcc Ala	cct Pro	gcc Ala	gcc Ala	ggc Gly 75	gcg Ala	ccc Pro	ctg Leu	atg Met 80	gac Asp 80	240
ttc Phe	gga Gly	aat Asn	gac Asp 85	ttc Phe 85	gtg Val	ccg Pro	ccg Pro	gcg Ala 90	ccc Pro 90	cgg Arg	gga Gly	ccc Pro	ctg Leu 95	ccg Pro 95	gcc Ala	288
gct Ala	ccc Pro	ccc Pro	gtc Val 100	gcc Ala	ccg Pro	gag Glu	cgg Arg	cag Gln 105	ccg Pro	tct Ser	tgg Trp	gac Asp 110	ccg Pro 110	agc Ser	ccg Pro	336
gtg Val	tcg Ser	tcg Ser 115	acc Thr	gtg Val	ccc Pro	gcg Ala	cca Pro 120	tcc Ser	ccg Pro	ctg Leu	tct Ser	gct Ala 125	gcc Ala	gca Ala	gtc Val	384
tcg Ser 130	ccc Pro	tcc Ser	aag Lys	ctc Leu	cct Pro	gag Glu 135	gac Asp	gac Asp	gag Glu	cct Pro	ccg Pro 140	gcc Ala	cgg Arg	cct Pro	ccc Pro	432
cct Pro	cct Pro	ccc Pro	ccg Pro	gcc Ala	agc Ser	gtg Val	agc Ser	ccc Pro	cag Gln	gca Ala	gag Glu	ccc Pro	gtg Val	tgg Trp	acc Thr	480

ES 2 425 768 T3

145					150					155					160	
ccg	cca	gcc	ccg	gct	ccc	gcc	gcg	ccc	ccc	tcc	acc	ccg	gcc	gcg	ccc	528
Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	
				165					170					175		
aag	cgc	agg	ggc	tcc	tcg	ggc	tca	gtg	gat	gag	acc	ctt	ttt	gct	ctt	576
Lys	Arg	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Val	Asp	Glu	Thr	Leu	Phe	Ala	Leu	
			180					185					190			
cct	gct	gca	tct	gag	cct	gtg	ata	cgc	tcc	tct	gca	gaa	aat	atg	gac	624
Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Ser	Ala	Glu	Asn	Met	Asp	
		195					200				205					
ttg	aag	gag	cag	cca	ggt	aac	act	att	tcg	gct	ggt	caa	gag	gat	ttc	672
Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Gly	Asn	Thr	Ile	Ser	Ala	Gly	Gln	Glu	Asp	Phe	
	210					215					220					
cca	tct	gtc	ctg	ctt	gaa	act	gct	gct	tct	ctt	cct	tct	ctg	tct	cct	720
Pro	Ser	Val	Leu	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	
225					230					235					240	
ctc	tca	gcc	gct	tct	ttc	aaa	gaa	cat	gaa	tac	ctt	ggt	aat	ttg	tca	768
Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	Phe	Lys	Glu	His	Glu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Leu	Ser	
				245					250					255		
aca	gta	tta	ccc	act	gaa	gga	aca	ctt	caa	gaa	aat	gtc	agt	gaa	gct	816
Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Glu	Gly	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Val	Ser	Glu	Ala	
			260					265					270			
tct	aaa	gag	gtc	tca	gag	aag	gca	aaa	act	cta	ctc	ata	gat	aga	gat	864
Ser	Lys	Glu	Val	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	Arg	Asp	
		275					280					285				
tta	aca	gag	ttt	tca	gaa	tta	gaa	tac	tca	gaa	atg	gga	tca	tcg	ttc	912
Leu	Thr	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	
	290					295					300					
agt	gtc	tct	cca	aaa	gca	gaa	tct	gcc	gta	ata	gta	gca	aat	cct	agg	960
Ser	Val	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Ser	Ala	Val	Ile	Val	Ala	Asn	Pro	Arg	
305					310					315					320	
gaa	gaa	ata	atc	gtg	aaa	aat	aaa	gat	gaa	gaa	gag	aag	tta	ggt	agt	1008
Glu	Glu	Ile	Ile	Val	Lys	Asn	Lys	Asp	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Val	Ser	
				325					330					335		
aat	aac	atc	ctt	cat	aat	caa	caa	gag	tta	cct	aca	gct	ctt	act	aaa	1056
Asn	Asn	Ile	Leu	His	Asn	Gln	Gln	Glu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Thr	Lys	
			340					345					350			
ttg	ggt	aaa	gag	gat	gaa	ggt	gtg	tct	tca	gaa	aaa	gca	aaa	gac	agt	1104
Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Asp	Ser	
		355					360					365				
ttt	aat	gaa	aag	aga	ggt	gca	gtg	gaa	gct	cct	atg	agg	gag	gaa	tat	1152
Phe	Asn	Glu	Lys	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Ala	Pro	Met	Arg	Glu	Glu	Tyr	
	370					375					380					
gca	gac	ttc	aaa	cca	ttt	gag	cga	gta	tgg	gaa	gtg	aaa	gat	agt	aag	1200
Ala	Asp	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Arg	Val	Trp	Glu	Val	Lys	Asp	Ser	Lys	
385					390					395					400	
gaa	gat	agt	gat	atg	ttg	gct	gct	gga	ggt	aaa	atc	gag	agc	aac	ttg	1248
Glu	Asp	Ser	Asp	Met	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	Ile	Glu	Ser	Asn	Leu	
				405					410					415		
gaa	agt	aaa	gtg	gat	aaa	aaa	tgt	ttt	gca	gat	agc	ctt	gag	caa	act	1296
Glu	Ser	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Cys	Phe	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Gln	Thr	
			420					425					430			

aat Asn	cac His	gaa Glu 435	aaa Lys	gat Asp	agt Ser	gag Glu	agt Ser 440	agt Ser	aat Asn	gat Asp	gat Asp	act Thr 445	tct Ser	ttc Phe	ccc Pro	1344
agt Ser	acg Thr 450	cca Pro	gaa Glu	ggt Gly	ata Ile	aag Lys 455	gat Asp	cgt Arg	tca Ser	gga Gly	gca Ala 460	tat Tyr	atc Ile	aca Thr	tgt Cys	1392
gct Ala 465	ccc Pro	ttt Phe	aac Asn	cca Pro	gca Ala 470	gca Ala	act Thr	gag Glu	agc Ser	att Ile 475	gca Ala	aca Thr	aac Asn	att Ile	ttt Phe 480	1440
cct Pro	ttg Leu	tta Leu	gga Gly	gat Asp 485	cct Pro	act Thr	tca Ser	gaa Glu	aat Asn 490	aag Lys	acc Thr	gat Asp	gaa Glu	aaa Lys 495	aaa Lys	1488
ata Ile	gaa Glu	gaa Glu	aag Lys 500	aag Lys	gcc Ala	caa Gln	ata Ile	gta Val 505	aca Thr	gag Glu	aag Lys	aat Asn	act Thr 510	agc Ser	acc Thr	1536
aaa Lys	aca Thr	tca Ser 515	aac Asn	cct Pro	ttt Phe	ctt Leu	gta Val 520	gca Ala	gca Ala	cag Gln	gat Asp	tct Ser 525	gag Glu	aca Thr	gat Asp	1584
tat Tyr	gtc Val 530	aca Thr	aca Thr	gat Asp	aat Asn	tta Val 535	aca Thr	aag Lys	gtg Val	act Thr	gag Glu 540	gaa Glu	gtc Val	gtg Val	gca Ala	1632
aac Asn 545	atg Met	cct Pro	gaa Glu	ggc Gly	ctg Leu 550	act Thr	cca Pro	gat Asp	tta Leu	gta Val 555	cag Gln	gaa Glu	gca Ala	tgt Cys	gaa Glu 560	1680
agt Ser	gaa Glu	ttg Leu	aat Asn	gaa Glu 565	ggt Val	act Thr	ggt Gly	aca Thr	aag Lys 570	att Ile	gct Ala	tat Tyr	gaa Glu	aca Thr 575	aaa Lys	1728
atg Met	gac Asp	ttg Leu	ggt Val 580	caa Gln	aca Thr	tca Ser	gaa Glu	ggt Val 585	atg Met	caa Gln	gag Glu	tca Ser	ctc Leu 590	tat Tyr	cct Pro	1776
gca Ala	gca Ala	cag Gln 595	ctt Leu	tgc Cys	cca Pro	tca Ser	ttt Phe 600	gaa Glu	gag Glu	tca Ser	gaa Glu	gct Ala 605	act Thr	cct Pro	tca Ser	1824
cca Pro	ggt Val 610	ttg Leu	cct Pro	gac Asp	att Ile	ggt Val 615	atg Met	gaa Glu	gca Ala	cca Pro	ttg Leu 620	aat Asn	tct Ser	gca Ala	ggt Val	1872
cct Pro 625	agt Ser	gct Ala	ggt Gly	gct Ala	tcc Ser 630	gtg Val	ata Ile	cag Gln	ccc Pro	agc Ser 635	tca Ser	tca Ser	cca Pro	tta Leu	gaa Glu 640	1920
gct Ala	tct Ser	tca Ser	ggt Val	aat Asn 645	tat Tyr	gaa Glu	agc Ser	ata Ile	aaa Lys 650	cat His	gag Glu	cct Pro	gaa Glu	aac Asn 655	ccc Pro	1968
cca Pro	cca Pro	tat Tyr	gaa Glu 660	gag Glu	gcc Ala	atg Met	agt Ser	gta Val 665	tca Ser	cta Leu	aaa Lys	aaa Lys	gta Val 670	tca Ser	gga Gly	2016
ata Ile	aag Lys	gaa Glu 675	gaa Glu	att Ile	aaa Lys	gag Glu	cct Pro 680	gaa Glu	aat Asn	att Ile	aat Asn	gca Ala 685	gct Ala	ctt Leu	caa Gln	2064
gaa Glu	aca Thr 690	gaa Glu	gct Ala	cct Pro	tat Tyr	ata Ile 695	tct Ser	att Ile	gca Ala	tgt Cys	gat Asp 700	tta Leu	att Ile	aaa Lys	gaa Glu	2112

ES 2 425 768 T3

aca Thr 705	aag Lys	ctt Leu	tct Ser	gct Ala 710	gaa Glu	cca Pro	gct Ala	ccg Pro	gat Asp	ttc Phe 715	tct Ser	gat Asp	tat Tyr	tca Ser	gaa Glu 720	2160
atg Met	gca Ala	aaa Lys	ggt Val	gaa Glu 725	cag Gln	cca Pro	gtg Val	cct Pro	gat Asp 730	cat His	tct Ser	gag Glu	cta Leu	ggt Val 735	gaa Glu	2208
gat Asp	tcc Ser	tca Ser	cct Pro 740	gat Asp	tct Ser	gaa Glu	cca Pro	ggt Val 745	gac Asp	tta Leu	ttt Phe	agt Ser	gat Asp 750	gat Asp	tca Ser	2256
ata Ile	cct Pro	gac Asp 755	ggt Val	cca Pro	caa Gln	aaa Lys	caa Gln 760	gat Asp	gaa Glu	act Thr	gtg Val	atg Met 765	ctt Leu	gtg Val	aaa Lys	2304
gaa Glu 770	agt Ser	ctc Leu	act Thr	gag Glu	act Thr	tca Ser 775	ttt Phe	gag Glu	tca Ser	atg Met 780	ata Ile	gaa Glu	tat Tyr	gaa Glu	aat Asn	2352
aag Lys 785	gaa Glu	aaa Lys	ctc Leu	agt Ser	gct Ala 790	ttg Leu	cca Pro	cct Pro	gag Glu	gga Gly 795	gga Gly	aag Lys	cca Pro	tat Tyr	ttg Leu 800	2400
gaa Glu	tct Ser	ttt Phe	aag Lys	ctc Leu 805	agt Ser	tta Leu	gat Asp	aac Asn	aca Thr 810	aaa Lys	gat Asp	acc Thr	ctg Leu	tta Leu 815	cct Pro	2448
gat Asp	gaa Glu	ggt Val	tca Ser 820	aca Thr	ttg Leu	agc Ser	aaa Lys	aag Glu 825	gag Glu	aaa Lys	att Ile	cct Pro	ttg Leu 830	cag Gln	atg Met	2496
gag Glu	gag Glu	ctc Leu 835	agt Ser	act Thr	gca Ala	ggt Val	tat Tyr 840	tca Ser	aat Asn	gat Asp	gac Asp	tta Leu 845	ttt Phe	att Ile	tct Ser	2544
aag Lys	gaa Glu 850	gca Ala	cag Gln	ata Ile	aga Arg	gaa Glu 855	act Thr	gaa Glu	acg Thr	ttt Phe	tca Ser 860	gat Asp	tca Ser	tct Ser	cca Pro	2592
att Ile 865	gaa Glu	att Ile	ata Ile	gat Asp	gag Glu 870	ttc Phe	cct Pro	aca Thr	ttg Leu	atc Ile 875	agt Ser	tct Ser	aaa Lys	act Thr	gat Asp 880	2640
tca Ser	ttt Phe	tct Ser	aaa Lys	tta Leu 885	gcc Ala	agg Arg	gaa Glu	tat Tyr	act Thr 890	gac Asp	cta Leu	gaa Glu	gta Val	tcc Ser 895	cac His	2688
aaa Lys	agt Ser	gaa Glu	att Ile 900	gct Ala	aat Asn	gcc Ala	ccg Pro	gat Asp 905	gga Gly	gct Ala	ggg Gly	tca Ser	ttg Leu 910	cct Pro	tgc Cys	2736
aca Thr	gaa Glu	ttg Leu 915	ccc Pro	cat His	gac Asp	ctt Leu	tct Ser 920	ttg Leu	aag Lys	aac Asn	ata Ile	caa Gln 925	ccc Pro	aaa Lys	ggt Val	2784
gaa Glu 930	gag Glu	aaa Lys	atc Ile	agt Ser	ttc Phe	tca Ser 935	gat Asp	gac Asp	ttt Phe	tct Ser	aaa Lys 940	aat Asn	ggg Gly	tct Ser	gct Ala	2832
aca Thr 945	tca Ser	aag Lys	gtg Val	ctc Leu	tta Leu 950	ttg Leu	cct Pro	cca Pro	gat Asp	ggt Val 955	tct Ser	gct Ala	ttg Leu	gcc Ala	act Thr 960	2880
caa Gln	gca Ala	gag Glu	ata Ile	gag Glu 965	agc Ser	ata Ile	ggt Val	aaa Lys	ccc Pro 970	aaa Lys	ggt Val	ctt Leu	gtg Val	aaa Lys 975	gaa Glu	2928
gct Glu	gag Glu	aaa Lys	aaa Lys	ctt Ser	cct Ser	tcc Ser	gat Asp	aca Thr	gaa Glu	aaa Lys	gag Glu	gac Asp	aga Thr	tca Ser	cca Pro	2976

ES 2 425 768 T3

Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro  
 980 985 990

tct gct ata ttt tca gca gag ctg agt aaa act tca gtt gtt gac ctc 3024  
 Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu  
 995 1000 1005

ctg tac tgg aga gac att aag aag act gga gtg gtg ttt ggt gcc 3069  
 Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala  
 1010 1015 1020

agc cta ttc ctg ctg ctt tca ttg aca gta ttc agc att gtg agc 3114  
 Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser  
 1025 1030 1035

gta aca gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tct gtg acc atc agc 3159  
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser  
 1040 1045 1050

ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat 3204  
 Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp  
 1055 1060 1065

gaa ggc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata 3249  
 Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile  
 1070 1075 1080

tct gag gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat 3294  
 Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His  
 1085 1090 1095

gtg aac tgc acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat 3339  
 Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp  
 1100 1105 1110

gat tta gtt gat tct ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gta ttt 3384  
 Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe  
 1115 1120 1125

acc tat gtt ggt gcc ttg ttt aat ggt ctg aca cta ctg att ttg 3429  
 Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu  
 1130 1135 1140

gct ctc att tca ctc ttc agt gtt cct gtt att tat gaa cgg cat 3474  
 Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His  
 1145 1150 1155

cag gca cag ata gat cat tat cta gga ctt gca aat aag aat gtt 3519  
 Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val  
 1160 1165 1170

aaa gat gct atg gct aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg aag 3564  
 Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys  
 1175 1180 1185

cgc aaa gct gaa tga aaacgcccaa aataattagt aggagtcat ctttaaaggg 3619  
 Arg Lys Ala Glu  
 1190

gatattcatt tgattatacg ggggagggtc agggaagaac gaaccttgac gttgcagtgc 3679

agtttcacag atcgttggtta gatctttatt ttagccatg cactgttggt aggaaaaatt 3739

acctgtcttg actgccatgt gttcatcatc ttaagtattg taagctgcta tgtatggatt 3799

taaaccgtaa tcatatcttt ttcctatctg aggcactggt ggaataaaaa acctgtatat 3859

tttactttgt tgcagatagt cttgccgat cttggcaagt tgcagagatg gtggagctag 3919

<210> 2

<211> 1192

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 425 768 T3

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

ES 2 425 768 T3

245				250				255							
Thr	Val	Leu	Pro 260	Thr	Glu	Gly	Thr	Leu 265	Gln	Glu	Asn	Val	Ser 270	Glu	Ala
Ser	Lys	Glu 275	Val	Ser	Glu	Lys	Ala 280	Lys	Thr	Leu	Leu	Ile 285	Asp	Arg	Asp
Leu	Thr 290	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu 295	Glu	Tyr	Ser	Glu	Met 300	Gly	Ser	Ser	Phe
Ser 305	Val	Ser	Pro	Lys	Ala 310	Glu	Ser	Ala	Val	Ile 315	Val	Ala	Asn	Pro	Arg 320
Glu	Glu	Ile	Ile	Val 325	Lys	Asn	Lys	Asp	Glu 330	Glu	Glu	Lys	Leu	Val 335	Ser
Asn	Asn	Ile	Leu 340	His	Asn	Gln	Gln	Glu 345	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu 350	Thr	Lys
Leu	Val	Lys 355	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Ala 365	Lys	Asp	Ser
Phe	Asn 370	Glu	Lys	Arg	Val	Ala 375	Val	Glu	Ala	Pro	Met 380	Arg	Glu	Glu	Tyr
Ala 385	Asp	Phe	Lys	Pro	Phe 390	Glu	Arg	Val	Trp	Glu 395	Val	Lys	Asp	Ser	Lys 400
Glu	Asp	Ser	Asp	Met 405	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly 410	Lys	Ile	Glu	Ser	Asn 415	Leu
Glu	Ser	Lys	Val 420	Asp	Lys	Lys	Cys	Phe 425	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu 430	Gln	Thr
Asn	His	Glu 435	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Ser	Asn	Asp	Asp	Thr 445	Ser	Phe	Pro
Ser	Thr 450	Pro	Glu	Gly	Ile	Lys 455	Asp	Arg	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ile	Thr	Cys
Ala 465	Pro	Phe	Asn	Pro	Ala 470	Ala	Thr	Glu	Ser	Ile 475	Ala	Thr	Asn	Ile	Phe 480
Pro	Leu	Leu	Gly	Asp 485	Pro	Thr	Ser	Glu	Asn 490	Lys	Thr	Asp	Glu	Lys 495	Lys
Ile	Glu	Glu	Lys 500	Lys	Ala	Gln	Ile	Val 505	Thr	Glu	Lys	Asn	Thr 510	Ser	Thr
Lys	Thr	Ser 515	Asn	Pro	Phe	Leu	Val 520	Ala	Ala	Gln	Asp	Ser 525	Glu	Thr	Asp

ES 2 425 768 T3

Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala  
 530 535 540  
 Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu  
 545 550 555  
 Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys  
 565 570  
 Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro  
 580 585 590  
 Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser  
 595 600 605  
 Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val  
 610 615 620  
 Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu  
 625 630 635  
 Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro  
 645 650 655  
 Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly  
 660 665 670  
 Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln  
 675 680 685  
 Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu  
 690 695 700  
 Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu  
 705 710 715 720  
 Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu  
 725 730 735  
 Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser  
 740 745 750  
 Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys  
 755 760 765  
 Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn  
 770 775 780  
 Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu  
 785 790 795 800

ES 2 425 768 T3

Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro  
 805 810 815  
 Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met  
 820 825 830  
 Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser  
 835 840 845  
 Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro  
 850 855 860  
 Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp  
 865 870 875 880  
 Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His  
 885 890 895  
 Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys  
 900 905 910  
 Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val  
 915 920 925  
 Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala  
 930 935 940  
 Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr  
 945 950 955 960  
 Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu  
 965 970 975  
 Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro  
 980 985 990  
 Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu  
 995 1000 1005  
 Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala  
 1010 1015 1020  
 Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser  
 1025 1030 1035  
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser  
 1040 1045 1050  
 Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp  
 1055 1060 1065

ES 2 425 768 T3

Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile  
 1070 1075 1080  
 Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His  
 1085 1090 1095  
 Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp  
 1100 1105 1110  
 Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe  
 1115 1120 1125  
 Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu  
 1130 1135 1140  
 Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His  
 1145 1150 1155  
 Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val  
 1160 1165 1170  
 Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys  
 1175 1180 1185  
 Arg Lys Ala Glu  
 1190

<210> 3

<211> 819

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(819)

<223> NiG humano

10 <400> 3

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

ES 2 425 768 T3

Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys  
 85 90 95  
 Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr  
 100 105 110  
 Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala  
 115 120 125  
 Val Ile Val Ala Asn Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp  
 130 135 140  
 Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser  
 165 170 175  
 Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu  
 180 185 190  
 Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val  
 195 200 205  
 Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly  
 210 215 220  
 Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser  
 245 250 255  
 Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg  
 260 265 270  
 Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu  
 275 280 285  
 Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu  
 290 295 300  
 Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala  
 325 330 335  
 Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys  
 340 345 350  
 Val Thr Glu Glu Val Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp

ES 2 425 768 T3

355                      360                      365  
 Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr  
 370                      375                      380  
 Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val  
 385                      390                      395                      400  
 Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu  
 405                      410                      415  
 Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu  
 420                      425                      430  
 Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln  
 435                      440                      445  
 Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile  
 450                      455                      460  
 Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val  
 465                      470                      475                      480  
 Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu  
 485                      490                      495  
 Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile  
 500                      505                      510  
 Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro  
 515                      520                      525  
 Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro  
 530                      535                      540  
 Asp His Ser Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val  
 545                      550                      555                      560  
 Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp  
 565                      570                      575  
 Glu Thr Val Met Leu Val Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu  
 580                      585                      590  
 Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro  
 595                      600                      605  
 Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn  
 610                      615                      620  
 Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys  
 625                      630                      635                      640

ES 2 425 768 T3

Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser  
 645 650 655

Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu  
 660 665 670

Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr  
 675 680 685

Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr  
 690 695 700

Thr Asp Leu Glu Val Ser His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp  
 705 710 715 720

Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu  
 725 730 735

Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp  
 740 745 750

Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro  
 755 760 765

Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys  
 770 775 780

Pro Lys Val Leu Val Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr  
 785 790 795 800

Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser  
 805 810 815

Lys Thr Ser

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

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

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 5

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Cys Asp Arg Leu Leu Ser Cys Arg  
 35 40 45

ES 2 425 768 T3

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

<210> 6

<211> 741

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 6

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt tagaagggtg ccagtgtgag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcctt gagactctcc      120
tgtgcagctt ctggattcac ctttagtaac tattggatga gctgggtccg ccaggtccg      180
gggaaagggc tggagtgggt ggccaccata aagcaagatg gaagtcagaa aaactatgtg      240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg      300

```

ES 2 425 768 T3

```

cgattgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagc tgaactcttc 360
gatctctggg gccgtggctc cctggtcacc gtctcctcag cctccacca gggcccatcg 420
gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 480
ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 540
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtccctcag gactctactc cctcagcagc 600
gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720
acatgcccac cgtgcccata a 741

```

<210> 7

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 7

```

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 360
gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgtgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

```

<210> 8

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

```

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser
1           5           10

```

<210> 9

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

Gly

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 10

Glu Leu Phe Asp Leu  
 1 5

<210> 11

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

<210> 12

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

20 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr  
 1 5

25

<210> 14

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus <  
 400> 14  
 5 agggccagtc agagtgttag cagctactta gcct 34  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 10 <400> 15  
 gatgcatcca acagggccac t 21  
 <210> 16  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 16  
 cagcagcgta gcaactggcc gatcacc 27  
 <210> 17  
 <211> 30  
 20 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 17  
 ggattcacct ttagtaacta ttggatgagc 30  
 <210> 18  
 25 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 18  
 accataaagc aagatggaag tcagaaaaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51  
 30 <210> 19

ES 2 425 768 T3

<211> 15

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 19

5 gaactcttcg atctc 15

<210> 20

<211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

10 <400> 20

atggagtttg ggctgagctg ggtttcctt gttgctatt tagaagggtg ccagtgt 57

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 21

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 22

<211> 60

20 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 22

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

<210> 23

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

ES 2 425 768 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly  
 20

<210> 24

<211> 460

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 24

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu  
 115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 130 135 140

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 165 170 175

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 180 185 190

ES 2 425 768 T3

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 195 200 205

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
 210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 325 330 335

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
 355 360 365

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
 420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 450 455 460

<210> 25

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 25

ES 2 425 768 T3

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

<210> 26

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 26

ES 2 425 768 T3

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20           25           30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35           40           45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50           55           60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg atc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85           90           95

acc ttc ggc caa ggg aca aag ctt gaa atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 27

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

```

100

105

<210> 28

10 <211> 342

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

ES 2 425 768 T3

<222> (1)..(342)

<400> 28

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtc	cag	cct	ggg	ggg		48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gct	tct	gga	ttc	acc	ttt	agt	aac	tat		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr		
			20					25					30				
tgg	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	ccg	ggg	aaa	ggg	ctg	gag	tgg	gtg		144
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
			35				40					45					
gcc	acc	ata	aag	caa	gat	gga	agt	cag	aaa	aac	tat	gtg	gac	tct	gtg		192
Ala	Thr	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Gln	Lys	Asn	Tyr	Val	Asp	Ser	Val		
		50				55					60						
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	tca	ctg	tat		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
					70					75					80		
ctg	cga	ttg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt		288
Leu	Arg	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
gcg	act	gaa	ctc	ttc	gat	ctc	tgg	ggc	cgt	ggc	tcc	ctg	gtc	acc	gtc		336
Ala	Thr	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val		
			100					105					110				
tcc	tca																342
Ser	Ser																

<210> 29

5 <211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

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

10 <210> 30

<211> 19

<212> PRT

ES 2 425 768 T3

<213> Mus musculus

<400> 30

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
1 5 10 15

Val Gln Ala

<210> 31

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys  
20

10 <210> 32

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 32

tgaggaagt agggatgtgc 20

<210> 33

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 33

25 caggtgatgt acgctctgga 20

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente al polipéptido NogoA humano (SEQ ID NO: 2) o NiG humano (SEQ ID NO: 3), dicho sitio de unión a antígeno comprende:
- 5 \* en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); y
- \* en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13).
2. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- 10 \* por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) y CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10) y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; y
- 15 \* por lo menos una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) y CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13) y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana.
3. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la parte constante o fragmento de la misma de la cadena pesada humana es del tipo  $\gamma 4$  y la parte constante o fragmento de la misma de la cadena ligera humana es del tipo  $\kappa$ .
- 20 4. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de unión es un anticuerpo monoclonal humano o quimérico o humanizado.
5. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 4 (IgG1 pesado), SEQ ID NO: 5 (IgG1 ligero), SEQ ID NO: 24 (IgG4 pesado) y SEQ ID NO: 25 (IgG4 ligero).
- 25 6. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende:
- 30 \* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; o
- \* por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.
8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.
9. Un sistema de expresión que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8, en donde dicho sistema de expresión o parte del mismo es capaz de producir un polipéptido de la reivindicación 1, cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula anfitriona compatible.
- 35 10. Una célula anfitriona aislada que comprende el vector de la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, un vector de expresión o sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, respectivamente, o una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 10, en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 40 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha composición es una composición de liberación lenta.

13. Un método para producir la molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende expresar el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 en un vector de expresión o sistema de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, respectivamente, por medio de tecnología de ADN recombinante o por medio de síntesis química.

Figura 1

ATG GAA GCC CGA GCT CAG GTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA  
M E A P A Q L L F L L L L H L P D T T G  
  
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC  
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T  
  
 CTC TCC TGC AGG GCG AGT CAG AGT GTT AGC ACC TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT  
 L S C R A S Q S V S S Y L A N Y Q Q K P  
  
 GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT CCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC  
 G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A  
  
 AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT  
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
  
 GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CTT AGC AAC TGG CCG ATC ACC TTC GGC CAA  
 E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q  
  
 GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA  
 G T R L E I K R T V A A F S V F I F P P  
  
 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GGC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT  
 S D E Q L K S G T A S V V C L L H N F Y  
  
 CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG  
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
  
 GAG AGT GTG ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC  
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T  
  
 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC  
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
  
 CTG AGC TCG CCC GTG ACA AAG AGC TTC AAC AGG GCA GAG TGT TAG  
 L S S P V T E S F H R G E C

Figura 2

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTC CAG TGT GAG  
 M E P G L S W V P L V A I L E G V Q C E  
 GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC  
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S  
 TGT GCA GCT TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TAT TGG ATG AGC TGG GTC GGC CAG GCT CCG  
 C A A S G P T F S N Y W M S W V R Q A P  
 GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC ACC ATA AAG CAA GAT GGA AGT CAG AAA AAC TAT GTG  
 G K G L E W V A T I K Q D G S Q E N Y V  
 GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG  
 D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L  
 CGA TTG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC AGC GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GAA CTC TTC  
 R L N S L R A E D T A V Y Y C A T E L F  
 GAT CTC TGG GGC CGT GGC TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG  
 D L W G R G S L V T V S S A S T K G P S  
 GTG TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GGG GGC CTG GGC TGC  
 V P P L A P S S K S T S G G T A A L G C  
 CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCC GTG AGG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC  
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T  
 AGC GGC GTG CAG ACC TTC CCC GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC  
 S G Y H T F P A V L Q S S G L Y S L S S  
 GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC  
 V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H  
 AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC  
 K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H  
 ACA TGC CCA CCC TGC CCA TAA  
 T C P P C P

Figura 3

Parte variable de cadena ligera de secuencia de ADN

gaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtcttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggcc  
agtcagagtgtagcagctactagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgat  
gcatccaaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggacagactcactcaccat  
cagcagcctagagcctgaagatttgcagtttactgtcagcagcgtagcaactggccgatcaccttcggcca  
agggacaaagctgaaatcaaa

Parte variable de cadena pesada de secuencia de ADN

gaggtcagctggtggagctctgggggaggcttggtccagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcttct  
ggattcaccttagtaactattggatgagctgggtccgccaggctccgggaaaggctggagtggtggccac  
cataaagcaagatggaagtcagaaaaactatgtggactctgtgaaggccgattcacctcaccagagacaa  
cgccaagaactcactgtatctgcgattgaacagcctgagagccgaggacacggctgtatctactgtgcgactg  
aactctcgatctctggggccgtggctccctggctaccgtctctca

Figura 4 .

Parte constante y variable de cadena ligera IgG4 6A3, que incluye secuencia líder:

LÍDER **CDRL-1**  
MSVLTQVLALLLLWLTGTRCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA  
 WY  
**CDRL-2**  
**CDRL-3**  
 QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQ  
 RSN  
**Ck**  
 WPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia aa completa de cadena pesada IgG4 6A3, CH1, región de articulación, CH2 y CH3:

LÍDER  
**CDR-H1**  
MAWVWTL PFLMAAAQSVQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNY  
 WM  
**CDR-H2**  
 SWVRQAPGKGLEWVATIKQDGSQKNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLRNLRLR  
 AE **CDR-H3**  
 DTAVYYCATELFDLWGRGSLVTVSS  
**CH1**  
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
 PAV ARTICULACIÓN  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV  
 ESKYGPPCPSCP  
**CH2**  
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  
 KAK  
**CH3**  
 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL  
 GK



Figura 6

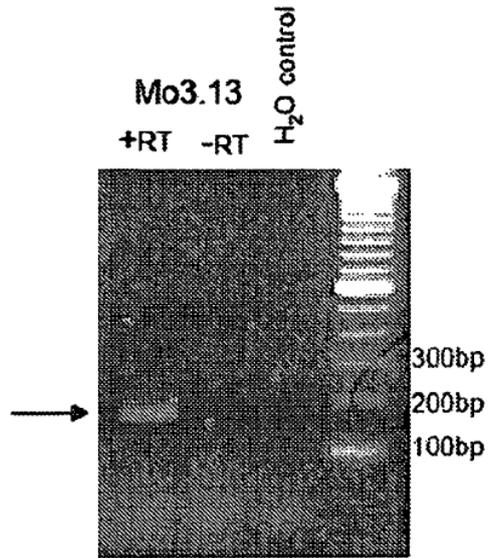


Figura 7

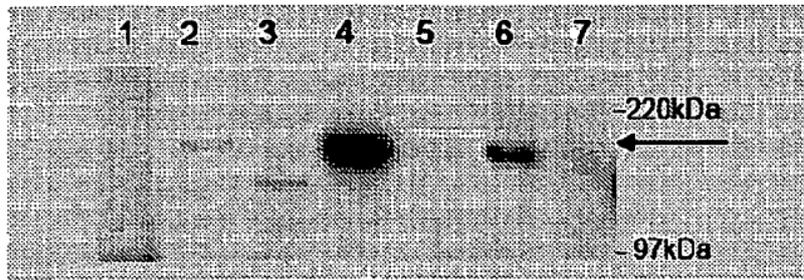
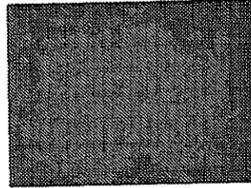
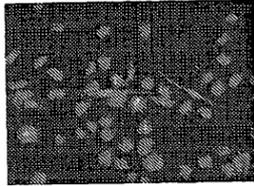


Figura 8

Figura 8a:  
Células MO3.13

5mM 6A3  
IgG4

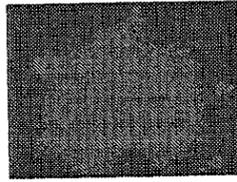
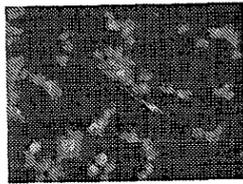


Solo Anticuerpo  
Secundario

Figura 8b:

Células HOG

5mM 6A3  
IgG4



Solo Anticuerpo  
Secundario

Figura 9

Cohorte=3 (15 mg/día durante 14 días)

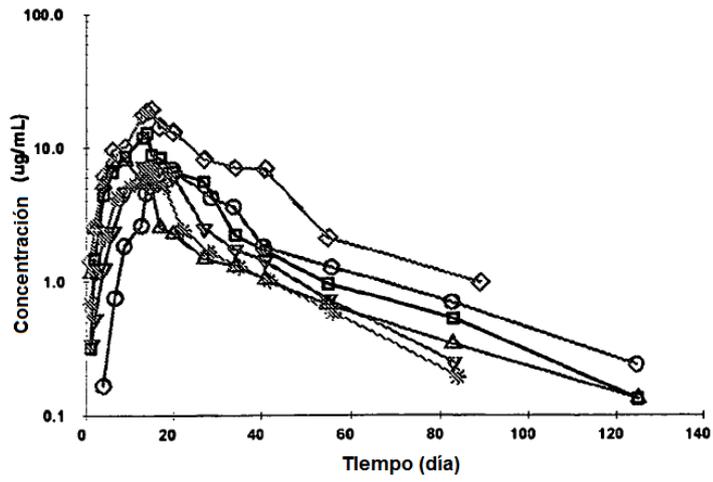
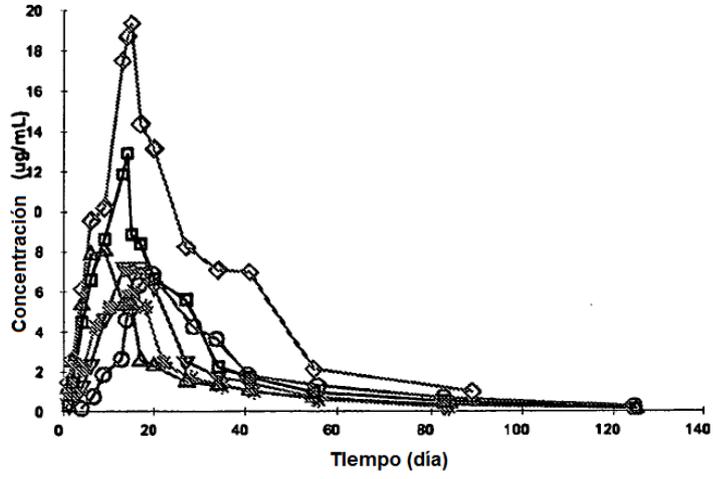


Figura 10

(15 mg/día durante 14 días)

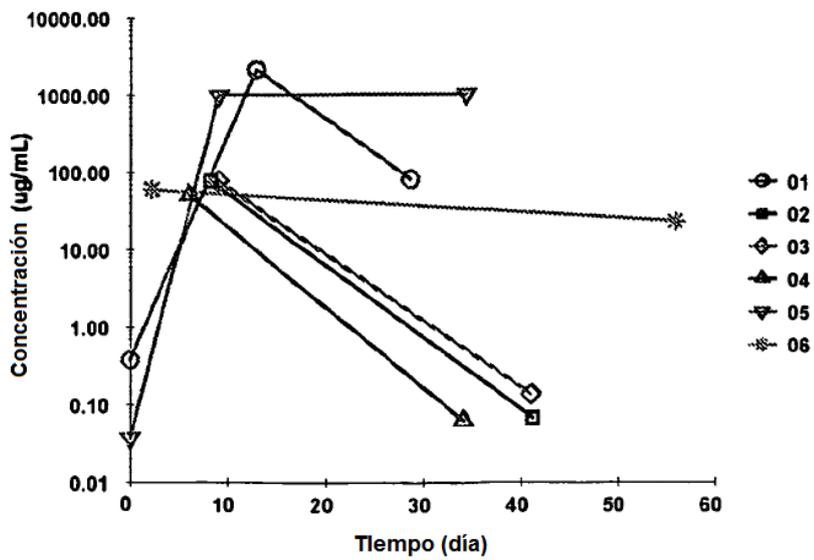
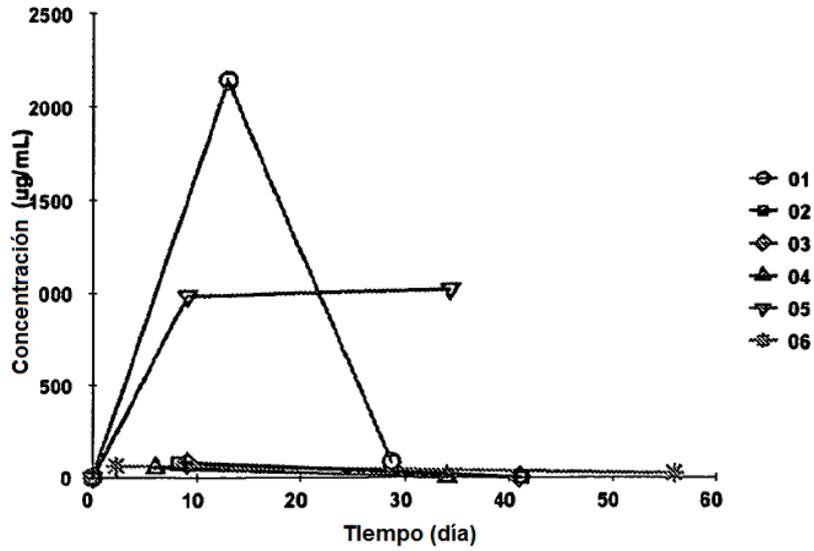


Figura 11

