

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 652**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2003 E 03784195 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1526868**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-MAG y sus usos para el tratamiento de apoplejía**

30 Prioridad:

06.08.2002 GB 0218230

06.08.2002 GB 0218232

06.08.2002 GB 0218234

06.08.2002 GB 0218229

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

29.01.2014

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ELLIS, JONATHAN HENRY y
GERMASCHEWSKI, VOLKER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 440 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados anti-MAG y sus usos para el tratamiento de apoplejía

Campo de la invención

5 La presente invención y divulgación se refiere a anticuerpos alterados que se unen a la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) y que neutralizan la función de la misma, a los polinucleótidos que codifican tales anticuerpos, a las formulaciones farmacéuticas que contienen los mencionados anticuerpos y al uso de tales anticuerpos en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas. Otros aspectos, objetos y ventajas de la presente invención se harán aparentes a partir de la descripción siguiente.

Antecedentes de la invención

10 La apoplejía es la principal causa de muerte e incapacidad en el Mundo Occidental. No existe una terapia válida para el tratamiento de la apoplejía distinta del t-PA que ha de administrarse en las 3 horas del comienzo tras un escáner para evitar la hemorragia. Hasta la fecha la mayoría de los agentes terapéuticos relacionados con el tratamiento de la apoplejía aguda (es decir, la neuroprotección) están enfocados predominantemente a los receptores de glutamato y sus vías de señalización inferiores son conocidas por estar implicadas en la muerte celular aguda. Sin embargo, hasta la fecha estas estrategias se han probado sin éxito en los ensayos clínicos y están asociadas frecuentemente con efectos secundarios de limitación de dosis (Hill & Hachinski, *The Lancet*, 352: (supl. III) 10 - 14 (1998)). Por lo tanto existe una necesidad para nuevos enfoques dirigidos hacia la mejora en la muerte celular tras el cese del flujo sanguíneo.

20 Tras el umbral de la apoplejía, se observa en muchos pacientes algo de recuperación funcional espontánea, lo que sugiere que el cerebro tiene la capacidad (aunque limitada) de repararse y/o remodelarse tras el daño. Por lo tanto los agentes que presentan el potencial para mejorar esta recuperación pueden permitir por lo tanto que esta se extienda mucho más (potencialmente días) tras la aparición de la isquemia cerebral. Los agentes que son capaces de ofrecer tanto la neuroprotección aguda como al mejora de la recuperación funcional pueden proporcionar ventajas significativas sobre las estrategias neuroprotectoras potenciales actuales.

25 Los mecanismos en los que se basa la recuperación funcional son desconocidos en la actualidad. Los brotes de axones dañados o no dañados se han propuesto como un posible mecanismo. Sin embargo, aunque los estudios *in vivo* han mostrado que el tratamiento del daño o apoplejía en la médula espinal con factores neurotróficos da lugar a una recuperación funcional mejor y a un grado de brote axónico, esto no prueba una conexión directa entre el grado de brote axónico y la extensión de la recuperación funcional (Jakeman y col. 1998, *Exp. Neurol.* 154: 170 - 184, Kawamata y col. 1997, *Proc Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 94: 8179 - 8184, Ribotta y col. 2000, *J Neurosci.* 20: 5144 - 5152). Además, el brote axónico requiere una neurona viable. En enfermedades tales como apoplejía que están asociadas con una muerte celular extensiva, la mejora en la recuperación funcional ofrecida por un agente dado tras la apoplejía puede, por tanto, tener lugar a través de mecanismos distintos al del brote axónico, tales como la diferenciación de células madre endógenas, activación de trayectorias redundantes, cambios en la distribución del receptor o excitabilidad de neuronas o neuroglía (Fawcett & Asher, 1999, *Brain Res. Bulletin*, 49: 377 - 391, Horner & Gage, 2000, *Nature* 407 963 - 970).

40 Se cree que la capacidad limitada del sistema nervioso central (CNS) para repararse tras el daño es debida, en parte, a moléculas del entorno del CNS que presentan un efecto inhibitorio sobre el brote axónico (excrecencia de la neurita). Se cree que la mielina del CNS contiene moléculas inhibitorias (Schwab ME y Caroni P (1988) *J. Neurosci.* 8, 2381-2193). Se han clonado e identificado dos proteínas de la mielina, la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) y la Nogo, como inhibidores putativos de la excrecencia de la neurita (Sato S. y col. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163, 1473 - 1480; McKerracher L y col. (1994) *Neuron* 13, 805 - 811; Mukhopadhyay G y col. (1994) *Neuron* 13, 757 - 767; Torigoe K y Lundborg G (1997) *Exp. Neurology* 150, 254 - 262; Schafer y col. (1996) *Neuron* 16, 1107 - 1113; WO9522344; WO9701352; Prinjha R y col. (2000) *Nature* 403, 383 - 384; Chen MS y col. (2000) *Nature* 403, 434 - 439; GrandPre T y col. (2000) *Nature* 403, 439 - 444; documentos US005250414A; WO200005364A1; WO0031235).

50 La glucoproteína asociada a la mielina es una molécula transmembrana de la superficie celular expresada sobre la superficie de la mielina que consiste en cinco dominios inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana único y un dominio intracelular. La expresión de la MAG se restringe a la neuroglía mielínica en el CNS y en el sistema nervioso periférico (PNS). Se cree que la MAG interactúa con el(los) receptor(es) neuronales que media(n) en los efectos del citoesqueleto neuronal incluyendo la fosforilación de los neurofilamentos y la inhibición de la excrecencia de la neurita *in vitro*. Aunque los antagonistas de la MAG se han postulado como útiles para la promoción del brote axónico tras el daño (documentos WO9522344, WO9701352 y WO9707810), estas reivindicaciones no están soportadas mediante datos *in vivo*. Además, el papel de la MAG como un inhibidor del brote axónico a partir de las neuronas del CNS *in vivo* no está probado (Li CM y col. (1994) *Nature* 369, 747 - 750; Montag, D y col. (1994) *Neuron* 13, 229 - 246; Lassmann H y col. (1997) *GLIA* 19, 104 - 110; Li C y col. (1998) *J. Neuro. Res.* 51, 210 - 217; Yin X y col. (1998) *J. Neurosci.* 18, 1953 - 1962; Bartsch U y col. (1995) *Neuron* 15 1375 - 1381; Li M y col. (1996) 46, 404 - 414).

60 Los anticuerpos comprenden típicamente dos cadenas pesadas unidas conjuntamente mediante enlaces de disulfuro y dos cadenas ligeras. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada respectiva mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo y un dominio constante en su otro extremo. El dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada. Los dominios constantes en las cadenas ligera y pesada no están involucrados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno.

Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el lugar de unión del antígeno. Los dominios variables en las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende una estructura de cuatro regiones, cuyas secuencias se conservan relativamente, conectadas por tres regiones de determinación complementarias (CDR) referidas frecuentemente como regiones hipervariables. Las cuatro regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación en lámina beta y las CDR forman lazos que conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura en lámina beta. Las CDR están alojadas muy próximamente a las regiones estructurales y con las CDR del otro dominio, contribuyen a la formación del lugar de unión del antígeno. Las CDR y las regiones estructurales de los anticuerpos se pueden determinar como describe Kabat y col. ("Sequences of proteins of immunological interest" US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1987).

Se ha encontrado ahora que un anticuerpo monoclonal anti-MAG, descrito (Poltorak y col. (1987) Journal of Cell Biology 105, 1893 - 1899, DeBellard y col. (1996) Mol. Cell. Neurosci. 7, 89 - 101; Tang y col. (1997) Mol. Cell. Neurosci. 9, 333 - 346; Torigoe K y Lundborg G (1997) Exp. Neurology 150, 254 - 262) y comercialmente disponible (MAB1567 (Chemicon)) cuando se administra directamente al cerebro o de forma intravenosa tras la isquemia cerebral focal en ratas (un modelo de apoplejía), proporciona neuroprotección y mejora la recuperación funcional. Por lo tanto los anticuerpos anti-MAG proporcionan agentes terapéuticos potenciales para la neuroprotección aguda así como también para la promoción de la recuperación funcional tras la apoplejía. Este anticuerpo es un anticuerpo murino. Aunque los anticuerpos murinos se emplean frecuentemente como agentes de diagnóstico su utilidad como un agente terapéutico se ha probado en solo unos pocos casos. Su aplicación limitada se debe en parte a la administración repetida de monoclonales murinos a humanos que normalmente causan respuestas inmunes en seres humanos frente a estas moléculas. Para superar estas propiedades no deseadas intrínsecas de los monoclonales murinos se han desarrollado anticuerpos "alterados" diseñados para incorporar regiones de anticuerpos humanos y se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado contiene regiones de determinación complementarias ("CDR") de origen no humano y la mayor parte del resto de la estructura se deriva de un anticuerpo humano.

El proceso de neurodegeneración subyace en muchas enfermedades / trastornos neurológicos incluyendo enfermedades agudas tales como apoplejía, daño cerebral traumático y daño en la médula espinal así como también en enfermedades crónicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, demencias frontotemporales (tauopatías), neuropatía periférica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-MAG puede ser útiles, por lo tanto, en el tratamiento de estas enfermedades / trastornos, tanto aminorando la muerte celular asociada con estas enfermedades / trastornos como promocionando la recuperación funcional.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona, en un primer aspecto, un anticuerpo anti-MAG alterado que se une a y neutraliza la MAG y comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N.º: 13, SEC ID N.º: 14 y SEC ID N.º: 15 y un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N.º: 16, SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y SEC ID N.º: 19.

Un aspecto más de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG humanizado de la presente invención de la misma junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un anticuerpo anti-MAG humanizado de la invención para el tratamiento o profilaxis de apoplejía. En otra realización, el anticuerpo humanizado de la invención puede administrarse intravenosamente.

Descripción de las figuras

Figura 1: secuencia de una cadena pesada de anticuerpo anti-MAG quimérica de ratón / humano (SEC ID N.º: 27).

Figura 2: secuencia de una cadena ligera de anticuerpo anti-MAG quimérica de ratón / humano (SEC ID N.º: 28).

Figura 3: secuencia de una cadena pesada de anticuerpo anti-MAG quimérica de ratón / humano SEC ID N.º: 29).

Figura 4: anticuerpo anti-MAG quimérico que se une a la MAG de rata.

Figura 5: secuencias de anticuerpo anti-MAG humanizadas.

Figura 6: anticuerpos anti-MAG humanizados que se unen a la MAG de rata.

Figura 7: anticuerpos anti-MAG humanizados que se unen a la MAG de rata.

Figura 8: anticuerpos anti-MAG humanizados que se unen a la MAG humana.

Figura 9: ELISA de competición por MAG con anticuerpos anti-MAG de ratón y humanizados.

Descripción detallada de la invención

Anticuerpo anti-MAG

El anticuerpo alterado de la divulgación es preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb) y es preferiblemente quimérico, humanizado o conformado, de estos se prefiere particularmente el humanizado.

El anticuerpo alterado de la divulgación y/o invención tiene preferiblemente la estructura de un anticuerpo natural o

un fragmento del mismo. El anticuerpo puede comprender por tanto un anticuerpo completo, un fragmento (Fab¹)₂, un fragmento Fab, un dímero de cadena ligera o un dímero de cadena pesada. El anticuerpo puede ser un IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; o un IgM; IgA, IgE o un IgD o una variante modificada de los mismos. El dominio constante de la cadena ligera puede ser un dominio constante kappa o lambda. Además el anticuerpo puede comprender modificaciones de todas las clases, por ejemplo dímeros IgG, mutantes Fc que ya no se unen a receptores Fc o uniones Clq mediadas (anticuerpos de bloqueo). El anticuerpo puede también ser un anticuerpo quimérico del tipo descrito en el documento WO86/01533 que comprende una región de unión al antígeno y una región no inmunoglobulínica. La región de unión al antígeno es un dominio variable de la cadena ligera o un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo. De forma típica la región de unión al antígeno comprende tanto dominios variables de la cadena ligera como de la pesada. La región no inmunoglobulínica se fusiona en su extremo C terminal con la región de unión del antígeno. La región no inmunoglobulínica es de forma típica una proteína no inmunoglobulina y puede ser una enzima, una toxina o una proteína que tiene especificidad de unión conocida. Las dos regiones de este tipo de anticuerpo quimérico pueden estar conectadas mediante una secuencia de unión escindible. Las inmunoadhesinas que tienen las CDR, tal como se describieron anteriormente, se contemplan también.

La región constante se selecciona de acuerdo con la funcionalidad requerida. Normalmente una IgG1 mostrará capacidad lítica mediante la unión para complementar y/o mediar la ADCC (citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo). Se preferirá una IgG4 si se requiere un anticuerpo de bloqueo no citotóxico. Sin embargo los anticuerpos IgG4 pueden mostrar inestabilidad en la producción y por lo tanto puede ser más preferible el modificar el generalmente más estable IgG1. Las modificaciones sugeridas se describen en el documento EPO307434, las modificaciones preferidas se encuentran en las posiciones 235 y 237. La invención proporciona por tanto una forma lítica o no lítica de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

En un aspecto preferido el anticuerpo alterado es de la clase IgG, más preferiblemente IgG1.

Por tanto en las formas preferidas el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que tiene las CDR descritas en el presente documento. En las formas más preferidas se proporciona un anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que presenta las CDR de SEC.I.D.N.º:13 y 16 y el anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que presenta las CDR de SEC.I.D.N.º: 15 y 18.

En un aspecto más, la invención proporciona polinucleótidos que codifican para CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Las secuencias de polinucleótidos preferidas son

CDR de la cadena ligera

CDR	
L1	AAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCC (SECUENCIA ID N.º: 7)
L2	TGGGCCAGCACCCGCGAGAGC (SECUENCIA IDS N.º: 8)
L3	CACCAGTACCTGAGCAGCCTGACC (SECUENCIA ID N.º: 9)

CDR de la cadena pesada

CDR	
H1	AACTACGGCATGAAC (SECUENCIA ID N.º: 10)
H2	TGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCCACCTACGCCGACGACTTCACCGGC (SECUENCIA ID N.º: 11)
H3	AACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCTACGTGATGGACTAC (SECUENCIA ID N.º: 12)

En un aspecto más, se proporciona un polinucleótido que codifica para una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-MAG alterado que incluye al menos una CDR seleccionada entre CDRL1, CDRL2 y CDRL3, más preferiblemente que incluya las 3 CDR en la secuencia.

En un aspecto más, se proporciona un polinucleótido que codifica para una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-MAG alterado que incluye al menos una CDR seleccionada entre CDRH1, CDRH2 y CDRH3, más preferiblemente que incluya las 3 CDR en la secuencia.

En un aspecto particularmente preferido, el anticuerpo anti-MAG de la invención es un anticuerpo humanizado.

Se proporciona además un anticuerpo humanizado que se une a y neutraliza la MAG, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

QVQLVQSGSELKKGASVVKVSKASGYTFT**NYGMN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTG**EPT**YADDFTG**RFVFLDTS

ES 2 440 652 T3

VSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARNNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (SEC ID N.º: 13).

QVQLVQSGSELKKGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTS
VSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARNNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (Secuencia ID N.º: 14)

5 QVQLVQSGSELKKGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTS
VSTAYLQISSSLKAEDTATYFCARNNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (Secuencia ID N.º: 15)

En un aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo humanizado que se une a la MAG que comprende la región variable de la cadena pesada de Secuencia ID N.º: 13, 14 o 15 junto con una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias de aminoácidos, Secuencias ID N.ºs: 16, 17, 18, o 19:

10 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISLQAEDVAVYYCHHQYLSSLTFGQGTKLEIKRTV (SEC ID N.º: 16)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTIIINLQAEDVAVYYCHHQYLSSLTFGQGTKLEIKRTV (SEC ID N.º: 17)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISLHTEDVAVYYCHHQYLSSLTFGQGTKLEIKRTV (SEC ID N.º: 18)

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTIIINLHTEDVAVYYCHHQYLSSLTFGQGTKLEIKRTV (SEC ID N.º: 19)

En un aspecto más de la presente invención, se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende:

un fragmento variable de la cadena pesada que consiste en la SEC ID N.º: 13, 14 o 15 y una parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana y

20 un fragmento variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 16, 17, 18 o 19 y una parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana.

En un aspecto preferido el anticuerpo humanizado es de la clase 1gG más preferiblemente 1gG1.

Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden:

25 Región variable de la cadena pesada Sec ID No 13 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 16;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 13 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 17;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 13 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 18;

30 Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 13 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 19;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 14 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 16;

35 Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 14 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 17;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 14 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 18;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 14 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 19.

40 Región variable de la cadena pesada Sec ID No 15 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 16;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 15 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 17;

45 Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 15 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 18;

Región variable de la cadena pesada SEC ID N.º: 15 y región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N.º: 19.

50 En un aspecto más, la invención proporciona polinucleótidos que codifican para la región variable de la cadena pesada que comprende las Secuencias ID N.ºs: 13, 14 y 15 y las regiones variables de la cadena ligera que comprenden las Secuencias ID N.ºs: 16, 17, 18 y 19.

La secuencia de polinucleótidos preferida que codifica la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 13 es

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTT
 CTGGATACACCTTCACT**AACTACGGCATGA**ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGACGACTTCACCGGCCGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC
 ACCTCTGTGACGACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAG
 5 AAACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCA
 CAGTCTCCTCA (SEC ID N.º: 20)

La secuencia de polinucleótido preferida que codifica para la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 14 es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTT
 CTGGATACACCTTCACT**AACTACGGCATGA**ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
 10 **ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGACGACTTCACCGGC**CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC
 ACCTCTGTGACGACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTTCTGTGCGAG
AAACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTAGT
 CACAGTCTCCTCA (SEC ID N.º: 21)

La secuencia de polinucleótido preferida que codifica para la secuencia de aminoácido SEC ID N.º: 15 es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTT
 CTGGATACACCTTCACT**AACTACGGCATGA**ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
 15 **ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGACGACTTCACCGGC**CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC
 ACCTCTGTGACGACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCC**CACTATTTCTGTGCGAG**
AAACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTAGT
 20 CACAGTCTCCTCA (SEC ID N.º: 22)

La secuencia de polinucleótido preferida que codifica la secuencia de aminoácido SEC ID N.º: 16 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCA**AAGA**
GCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAACT**ACCTGGCC**TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC
 25 CTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTC
 TGGGACAGATTTCACTCTACCCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT**CACCAGTACC**
TGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID N.º: 23)

La secuencia de polinucleótido preferida que codifica para la SEC ID N.º: 17 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCA**AAGA**
GCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAACT**ACCTGGCC**TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC
 30 CTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTC
 TGGGACAGATTTCACTCTACCCAT**CATCAAC**CTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT**CACCAGTACCT**
GAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID N.º: 24)

El polinucleótido preferido que codifica para la SEC ID N.º: 18 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCA**AAGA**
GCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAACT**ACCTGGCC**TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC
 35 CTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTC
 TGGGACAGATTTCACTCTACCCATCAGCAGCCTGC**ACACCC**GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT**CACCAGTACC**
TGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID N.º: 25)

El polinucleótido preferido que codifica para la SEC ID N.º: 19 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCA**AAGA**
GCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAACT**ACCTGGCC**TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC
 40 CTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTC
 TGGGACAGATTTCACTCTACCCAT**CATCAAC**CTGC**ACACCC**GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT**CACCAGTACC**
TGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID N.º: 26)

45 “Neutralización” se refiere a la inhibición, bien total o bien parcial, de la función de la MAG incluyendo su unión a neuronas y la inhibición de la excrecencia de la neurita.

“Anticuerpo alterado” se refiere a una proteína codificada por una región que codifica para la inmunoglobulina alterada, que se puede obtener mediante la expresión en una célula huésped seleccionada. Tales anticuerpos alterados incluyen anticuerpos manipulados (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, conformados, humanizados o vectorizados) o fragmentos de anticuerpos a los que les falta toda o parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, la Fv, Fab, o F(ab)₂ y similares.

50 “Región que codifica para la inmunoglobulina alterada” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo alterado. Cuando el anticuerpo alterado es un anticuerpo injertado con CDR o humanizado, las secuencias que codifican para las regiones determinantes complementarias (CDR) de una inmunoglobulina no humana se insertan en una primera secuencia compañera de la inmunoglobulina que comprende las secuencias estructurales variables humanas. De forma opcional, la primera secuencia compañera de inmunoglobulina está unida de forma operativa a una segunda secuencia compañera de inmunoglobulina.

60 “Primera secuencia compañera de inmunoglobulina” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una región estructural humana o una región variable de inmunoglobulina humana en la que las regiones que codifican para la CDR nativa (o de origen natural) se encuentran reemplazadas por las regiones que codifican para las CDR de un anticuerpo dador. La región variable humana puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena

ligeras (o ambas cadenas), fragmentos análogos o funcionales de las mismas. Tales regiones CDR, localizadas dentro de la región variable de los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden determinar por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)) describen reglas para la localización de las CDR. Además, se conocen programas informáticos que son útiles para la identificación de las regiones / estructuras de las CDR.

“Segunda secuencia compañera de inmunoglobulina” se refiere a otra secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína o péptido a la que la primera secuencia compañera de inmunoglobulina se fusiona en fase o por medio de una secuencia de unión convencional opcional (es decir, unida de forma operativa). Preferiblemente es un gen de inmunoglobulina. La segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica toda la región constante para la misma (es decir, homóloga— los primeros y segundos anticuerpos alterados se derivan de la misma fuente) o para un anticuerpo adicional de interés (es decir, heterólogo). Puede ser una cadena pesada o una cadena ligera de inmunoglobulina (o ambas cadenas como parte de un polipéptido único). La segunda secuencia compañera de inmunoglobulina no está limitada a una clase o isotipo de inmunoglobulina particular. Además, la segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede comprender parte de una región constante de inmunoglobulina, tal como se encuentra en un Fab, o $F(ab)_2$ (es decir, una parte discreta de una región constante humana apropiada o región estructural). La mencionada segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede también comprender una secuencia que codifica para una proteína de membrana integral expuesta en la superficie exterior de una célula huésped, por ejemplo, como parte de una librería de exposición de fagos, o una secuencia que codifica para una proteína para la detección analítica o diagnóstico, por ejemplo peroxidasa de rábano rústico, β -galactosidasa, etc.

Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o $F(ab)_2$ se emplean con sus significados convencionales (véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo manipulado” describe un tipo de anticuerpo alterado, es decir, un anticuerpo sintético de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, conformado o humanizado en oposición a un fragmento de anticuerpo) en el que una parte de los dominios variables de la cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor seleccionado se reemplaza por las partes análogas de uno o más anticuerpos dadores que presentan especificidad por el epítipo seleccionado. Por ejemplo, tales moléculas pueden incluir anticuerpos caracterizados por una cadena pesada humanizada asociada con una cadena ligera no modificada (o cadena ligera quimérica) o viceversa. Los anticuerpos manipulados pueden caracterizarse también por una alteración de las secuencias de ácido nucleico que codifican para las regiones estructurales del dominio variable ligero y/o pesado del anticuerpo aceptor con el fin de conservar la especificidad de unión por el anticuerpo dador. Estos anticuerpos pueden comprender el reemplazo de una o más CDR (preferiblemente todas) del anticuerpo aceptor con las CDR de un anticuerpo dador descrito en el presente documento.

Un “anticuerpo quimérico” se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado que contiene una región variable de origen natural (cadena ligera y cadenas pesadas) derivada de un anticuerpo dador junto con regiones constantes de las cadenas ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado que presenta sus CDR derivadas de una inmunoglobulina dadora no humana, derivándose el resto de las partes derivadas de la inmunoglobulina de la molécula de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos soporte estructurales pueden estar alterados para conservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen y col., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029 - 10032 (1989), Hodgson y col., *Bio/Technology*, 9: 421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, base de datos Los Alamos y base de datos Swiss Protein, mediante homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo dador. Puede ser adecuado un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones estructurales del anticuerpo dador (o una base de aminoácidos) para proporcionar una región constante de la cadena pesada y/o una región estructural variable de la cadena pesada para la inserción de las CDR dadoras. Se puede seleccionar de forma similar un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones constantes o estructurales variables de la cadena ligera. Se debería notar que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no se requiere que se originen a partir del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe diferentes vías de producción de los mencionados anticuerpos humanizados – véanse por ejemplo los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

“Anticuerpo humano conformado” se refiere a un anticuerpo alterado en el que mínimamente al menos una CDR de un primer anticuerpo dador monoclonal humano se encuentra sustituida por una CDR en un segundo anticuerpo aceptor humano. Preferiblemente todas las seis CDR se encuentran reemplazadas. Más preferiblemente está sustituida una región entera de combinación del antígeno (por ejemplo la Fv, Fab o $F(ab)_2$) de un primer anticuerpo monoclonal dador humano por la región correspondiente en un segundo anticuerpo monoclonal aceptor humano. Lo más preferiblemente la región Fab de un primer dador humano está unida de forma operativa con las regiones constantes apropiadas de un segundo anticuerpo aceptor humano para formar un anticuerpo monoclonal de longitud completa.

Un “anticuerpo vectorizado” se refiere a un anticuerpo al que se ha unido un agente para mejorar el transporte a través de la barrera cerebral sanguínea (BBB). (Revisar viendo Partridge; *Advanced Drug Delivery Review* 36, 299 - 321, 1999). La unión puede ser química o alternativamente puede sintetizarse el resto en el anticuerpo. Un ejemplo es preparar una quimera con un anticuerpo dirigido hacia un receptor celular del endotelio capilar del cerebro por ejemplo un anticuerpo receptor anti-insulina o un anticuerpo receptor anti-transferrina (Saito y col. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92 10227 - 31; Partridge y col. (1995) *Pharm. Res.* 12 807 - 816; Broadwell y col. (1996) *Exp. Neurol.* 142 47 - 65; Bickel y col. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 2618-2622; Friden y col. (1996) *J. Pharm. Exp. Ther.* 278 1491 - 1498, documentos US5182107, US5154924, US5833988, US5527527). Una vez unido al receptor, ambos componentes del anticuerpo biespecífico pasan a través de la BBB mediante el proceso de la

transcitosis. De forma alternativa el agente puede ser un ligando que se une a los mencionados receptores de superficie celulares, por ejemplo la insulina, transferrina o lipoproteína de baja densidad (Descamps y col. (1996) Am. J. Physiol. 270 H1149-H1158; Duffy y col. (1987) Brain Res. 420 32 - 38; Dehouck y col. (1997) J. Cell Biol. 1997 877 - 889). Se pueden emplear también péptidos de origen natural tales como la penetratina y SynB1 y Syn B3 que se conocen por mejorar el transporte a través de la BBB (Rouselle y col. (2000) Mol. Pharm. 57, 679 - 686 y Rouselle y col. (2001) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 296, 124 - 131).

El término "anticuerpo dador" se refiere a un anticuerpo (monoclonal o recombinante), que contribuye a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR, u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos para una primera secuencia compañera de inmunoglobulina, tal como para proporcionar la región de codificación de la inmunoglobulina alterada y dar lugar al anticuerpo alterado expresado con la especificidad antigénica y la actividad neutralizante características del anticuerpo dador.

El término "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal, o recombinante) heterólogo respecto al anticuerpo donador, que contribuye en todas (o en cualquier parte, pero preferiblemente en todas) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones estructurales de la cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera de la primera secuencia compañera de inmunoglobulina. Preferiblemente el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

"CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región de determinación complementaria de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera (o regiones CDR) en la parte variable de una inmunoglobulina. Así pues, las "CDR" tal como se usa en el presente documento se refieren a las tres CDR de cadena pesada, o a las tres CDR de cadena ligera (o a todas las CDR de cadena pesada y ligera, si fuese adecuado). La estructura y plegamiento de la proteína del anticuerpo puede significar que otros residuos se consideren parte de la región de unión del antígeno y un especialista en la técnica así lo entendería. Véase por ejemplo Chothia y col., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, pág. 877 - 883. Por conveniencia las CDR tal como se definen por Kabat en las SEC ID N.ºs 13 - 26 están subrayadas.

Las CDR proporcionan la mayoría de los residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o al epítipo. Las CDR de interés en la presente invención y divulgación se derivan de las secuencias de cadena pesada y ligera variables del anticuerpo dador, e incluyen análogos de las CDR de origen natural, tales análogos también participan de o conservan la misma especificidad de unión por el antígeno y/o capacidad de neutralización del antígeno que el anticuerpo dador del que se derivaron.

Un "fragmento funcional" es una secuencia variable de cadena pesada o ligera parcial (por ejemplo, eliminaciones menores en el término amino o carboxi de la región variable de la inmunoglobulina) que conserva la misma especificidad de unión por el antígeno y/o capacidad de neutralización que el anticuerpo del que se derivó el fragmento.

Un "análogo" es una secuencia de aminoácido modificada por al menos un aminoácido, en el que la mencionada modificación puede ser química o una sustitución o una redistribución de unos pocos aminoácidos (es decir, no más de 10), cuya modificación permite que la secuencia de aminoácidos conserve las características biológicas, por ejemplo, la especificidad por el antígeno y la alta afinidad de la secuencia no modificada. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones (silenciosas), mediante sustituciones, cuando se generen ciertos sitios de restricción de endonucleasas dentro o alrededor de las regiones que codifican las CDR. La presente invención tiene en cuenta el uso de análogos de los anticuerpos de la invención o divulgación. Se conoce bien que los cambios minoritarios en secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos pueden llevar por ejemplo a una forma alélica de la proteína original que mantiene sustancialmente propiedades similares. Así pues los análogos del anticuerpo de la invención o divulgación incluyen aquellos en los que las CDR en la región hipervariable de las cadenas pesada y ligera son al menos homólogas en un 80%, preferiblemente al menos homólogas en un 90% y más preferiblemente al menos homóloga en un 95% a las CDR según se definieron anteriormente como CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y conservan la actividad de neutralización de la MAG. Las secuencias de aminoácidos son al menos homólogas en un 80% si presentan un 80% de residuos aminoacídicos idénticos en una posición similar cuando las secuencias están óptimamente alineadas, contándose los huecos e inserciones como residuos no idénticos. La divulgación también tiene en cuenta análogos de los anticuerpos de la invención o divulgación en los que las regiones estructurales son homólogas en al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90% y más preferiblemente al menos un 95% a las regiones estructurales descritas en las SEC ID N.ºs: 1 - 5. Las secuencias de aminoácidos son al menos homólogas en un 80% si presentan un 80% de residuos aminoacídicos en una posición similar cuando las secuencias se encuentran alineadas óptimamente, contándose los huecos e inserciones como residuos no idénticos.

Los análogos pueden también presentarse como variaciones alélicas. Una "variación o modificación alélica" es una alteración en la secuencia de ácido nucleico. Tales variaciones o modificaciones se pueden deber a la degeneración en el código genético o pueden manipularse deliberadamente para proporcionar unas características deseadas. Estas variaciones o modificaciones pueden dar lugar o no pueden dar lugar a alteraciones en cualquier secuencia de aminoácido codificada.

El término "agentes efectores" se refiere a moléculas vehículo no proteicas a las que pueden estar asociadas por medios convencionales los anticuerpos alterados, y/o las cadenas ligeras o pesadas naturales o sintéticas del anticuerpo dador u otros fragmentos del anticuerpo dador. Tales vehículos no proteicos pueden incluir vehículos convencionales empleados en el campo de la diagnosis, por ejemplo, esferas de poliestireno u otros plásticos, polisacáridos, por ejemplo, tal como se usan en el sistema BIAcore [Farmacia], u otras sustancias no proteicas útiles en el campo médico y seguras para su administración a seres humanos y animales. Otros agentes efectores

pueden incluir un macrociclo, para quelar un átomo de metal pesado, o radioisótopos. Tales agentes efectores pueden también ser útiles para incrementar la semivida de los anticuerpos alterados, por ejemplo, el polietilenglicol.

Se ha descrito un anticuerpo neutralizante específico para la MAG (Poltorak y col. (1987) *Journal of Cell Biology* 105, 1893 - 1899, DeBellard y col. (1996) *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 89 - 101; Tang y col. (1997) *Mol. Cell. Neurosci.* 9, 333 - 346; Torigoe K y Lundborg G (1997) *Exp. Neurology* 150, 254 - 262) y está comercialmente disponible (MAB1567 (Chemicon)).

De forma alternativa, alguien puede construir anticuerpos, anticuerpos y fragmentos alterados, mediante la inmunización de una especie no humana (por ejemplo, bovina, ovina, mono, pollo, roedores (por ejemplo, murinos y rata), etc.) para generar una inmunoglobulina deseada tras presentación con la MAG nativa de cualquier especie contra la que puedan generarse anticuerpos por reacción cruzada con la MAG humana, por ejemplo ser humano o pollo. Se emplean técnicas de hibridoma convencionales para proporcionar una línea celular de hibridoma que segregue mAb no humana para MAG. Se somete a seguimiento luego la unión de tales hibridomas empleando MAG revestida sobre placas de 384 o 96 pocillos, con MAG biotinilada unida a una placa revestida de estreptavidina, o en un inmunoensayo ligado a europio – APC homogéneo empleando MAG biotinilada.

Se puede producir un anticuerpo humano nativo en un ratón de anticuerpo humano tal como el "Xenomouse" (Abgenix) donde los genes de inmunoglobulinas del ratón se han eliminado y se han insertado los genes que codifican las inmunoglobulinas humanas en el cromosoma del ratón. Se inmunizan los ratones normalmente y se desarrolla una respuesta al anticuerpo que se deriva de los genes humanos. Así pues, el ratón produce anticuerpos humanos obviando la necesidad de humanizar la selección posterior de hibridomas positivos. (véase Green L.L., *J Immunol Methods* 10 de diciembre de 1999; 231 (1 - 2):11 - 23).

La presente divulgación también incluye el uso de fragmentos de Fab o fragmentos de F(ab')₂ derivados de mAbs dirigidos contra la MAG. Estos fragmentos son útiles como agentes protectores *in vivo*. Un fragmento Fab contiene toda la cadena ligera y la parte terminal amino de la cadena pesada; y un fragmento F(ab')₂ es el fragmento formado por dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro. Los fragmentos Fab y los fragmentos F(ab')₂ se pueden obtener por medios convencionales, por ejemplo, excisión del mAb con las enzimas proteolíticas adecuadas, papaína y/o pepsina, o por procedimientos recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ son útiles por sí mismos como agentes terapéuticos o profilácticos y como dadores de secuencias que incluyen las regiones variables y las secuencias CDR útiles en la formación de anticuerpos recombinantes o humanizados tal como se describe en el presente documento.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden construir también mediante una librería de fagos combinatoria (véase, por ejemplo, Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12 :433 - 455 (1994)) o mediante evasión de la cadena de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Marks y col., *Bio/Technology*, 10 :779 - 783 (1992), que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Así pues los fragmentos de anticuerpo humano (Fv, scFv, Fab) específicos para la MAG se pueden aislar empleando librerías de exposición de fagos de fragmentos de anticuerpos humanos. Se amolda una librería de partículas bacteriófagas que exhibe las proteínas de fragmentos de anticuerpos humanos contra la proteína MAG. Estos fagos que muestran fragmentos de anticuerpos que se unen a la MAG se retienen en la librería y se amplifican clonalmente. Los genes de anticuerpos humanos se escinden después del bacteriófago específico y se insertan en construcciones de expresión IgG humanas que contienen las regiones constantes IgG humanas para formar la molécula IgG humana intacta con las regiones variables a partir del bacteriófago aislado específico para la MAG.

Los anticuerpos dadores pueden contribuir a secuencias, tales como las secuencias peptídicas de cadena pesada y/o ligera variables, las secuencias estructurales, las secuencias de la CDR, los fragmentos funcionales y los análogos de las mismas y las secuencias de ácido nucleico que las codifican, útiles en el diseño y obtención de diversos anticuerpos alterados que se caracterizan por la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo dador.

Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, se pueden construir diversas secuencias de codificación que codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera variable y para las secuencias de la CDR, así como también para fragmentos funcionales y análogos de los mismos que comparten la especificidad por el antígeno del anticuerpo dador. Las secuencias de ácido nucleico aisladas, o los fragmentos de las mismas, que codifican las secuencias de péptidos de la cadena variable o de las CDR se pueden emplear para producir anticuerpos alterados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados, u otros anticuerpos manipulados cuando se combinen de forma operativa con una segunda secuencia compañera de inmunoglobulina.

Las moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden codificar anticuerpos alterados que incluyen anticuerpos manipulados tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Una región que codifique inmunoglobulina alterada deseada contiene regiones que codifican la CDR que codifican péptidos que tienen la especificidad por el antígeno de un anticuerpo anti-MAG, preferiblemente un anticuerpo de alta afinidad, insertado en una primera secuencia compañera de inmunoglobulina (una región estructural humana o variable de inmunoglobulina humana).

Preferiblemente, la primera secuencia compañera de inmunoglobulina está unida de forma operativa a una segunda secuencia compañera de inmunoglobulina. La segunda secuencia compañera de inmunoglobulina se definió anteriormente y puede incluir una secuencia que codifica una segunda región de anticuerpo de interés, por ejemplo una región Fc. Las segundas secuencias compañeras de inmunoglobulina pueden también incluir secuencias que codifican para otra inmunoglobulina a la que está fusionada la región constante de cadena ligera o pesada en la estructura o por medio de una secuencia de unión. Los anticuerpos manipulados dirigidos contra los fragmentos funcionales o análogos de la MAG se pueden diseñar para obtener unión mejorada.

La segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede también estar asociada con agentes efectores según

se definieron anteriormente, incluyendo moléculas vehículo no proteicas, a las que la segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede estar unida de forma operativa por medios convencionales.

La fusión o unión entre las segundas secuencias compañeras de inmunoglobulina, por ejemplo, secuencias de anticuerpos y el agente efector, puede ser mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante enlaces covalentes o iónicos convencionales, fusiones de proteínas, o reticulaciones heterobifuncionales, por ejemplo, carbodiimida, glutaraldehído y similares. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen fácilmente en los textos de química y bioquímica convencionales.

De forma adicional, las secuencias de unión convencionales que proporcionan simplemente una cantidad de espacio deseada entre la segunda secuencia compañera de inmunoglobulina y el agente efector se pueden construir en la región de codificación de la inmunoglobulina alterada. El diseño de las mencionadas uniones es bien conocido por los especialistas en la técnica. En otros aspectos, se proporcionan diacuerpos (bivalentes o biespecíficos), triacuerpos, tetracuerpos y otras especies de proteínas scFCV multivalentes que tienen una o más CDR según se describen anteriormente que se unen a y neutralizan la función de la MAG.

Aún en otra realización más, los anticuerpos de la invención o divulgación pueden tener unido a ellos un agente adicional. Por ejemplo, se puede emplear el procedimiento de tecnología del ADN recombinante para producir un anticuerpo manipulado de la invención en el que el fragmento Fc o el dominio CH2-CH3 de una molécula de anticuerpo completa se ha reemplazado por una enzima u otra molécula detectable (es decir, un efector polipeptídico o molécula reportera).

La segunda secuencia compañera de inmunoglobulina puede estar también unida de forma operativa a un péptido, proteína o fragmento de la misma no inmunoglobulínico heterólogo a la secuencia que contiene la CDR que tiene la especificidad por el antígeno del anticuerpo anti-MAG. La proteína resultante puede mostrar tanto especificidad por el antígeno anti-MAG como características de no inmunoglobulina tras la expresión. Estas características de la secuencia compañera de fusión pueden ser, por ejemplo, una característica funcional tal como otro dominio de unión o receptor, o una característica terapéutica si la secuencia compañera de fusión es por sí misma una proteína terapéutica, o características antigénicas adicionales.

Otra proteína deseable de esta invención y divulgación puede comprender una molécula de anticuerpo completa, que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa, o cualquier fragmento discreto de las mismas, tales como los fragmentos Fab o F(ab')₂, un dímero de cadena pesada, o cualesquiera fragmentos mínimamente recombinantes de los mismos tales como un F_v o un anticuerpo de cadena única (SCA) o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el mAb dador seleccionado. Se puede emplear la mencionada proteína en forma de un anticuerpo alterado, o se puede emplear en su forma no fusionada.

Mientras que la segunda secuencia compañera de inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo diferente del anticuerpo dador, por ejemplo, cualquier isotipo o clase de regiones estructurales o constantes de la inmunoglobulina da como resultado un anticuerpo manipulado. Los anticuerpos manipulados pueden comprender regiones constantes de inmunoglobulinas (Ig) y regiones estructurales variables de una fuente, por ejemplo, el anticuerpo aceptor y una o más (preferiblemente todas) las CDR del anticuerpo dador. Además, se pueden realizar alteraciones, por ejemplo, eliminaciones, sustituciones o adiciones de la región estructural del dominio variable ligero y/o pesado del mAb aceptor en los niveles de ácido nucleico o aminoácido, o las regiones CDR del dador se puede preparar con el fin de conservar la especificidad de unión por el antígeno del anticuerpo dador.

Tales anticuerpos manipulados se diseñan para emplear una (o ambas) cadenas pesadas y/o ligeras variables del mAb anti-MAG o una o más de las CDR de cadena pesada o ligera. Los anticuerpos manipulados se pueden neutralizar según se definió anteriormente.

Los mencionados anticuerpos manipulados pueden incluir un anticuerpo humanizado que contiene regiones estructurales de una inmunoglobulina humana seleccionada o un subtipo humano seleccionado, o un anticuerpo quimérico que contiene las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas fusionadas con los fragmentos seleccionados del anticuerpo anti-MAG. Un anticuerpo aceptor humano (o de otro animal) adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, la base de datos Los Alamos y la base de datos Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo dador. Puede ser adecuado un anticuerpo humano caracterizado por una homología de las regiones estructurales del anticuerpo dador (o una base de aminoácidos) para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región estructural variable de cadena pesada para la inserción de la CDR dadora. Se puede seleccionar un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones estructurales constantes o variables de cadena ligera de una forma similar. Se debería notar que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no se requieren para originarse a partir del mismo anticuerpo aceptor.

De forma deseable las regiones estructurales y constantes heterólogas se seleccionan de las clases e isotipos de inmunoglobulina humana, tales como IgG (subtipos 1 a 4), IgM, IgA e IgE. Sin embargo el anticuerpo aceptor no necesita comprender solo secuencias de proteínas de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo un gen se puede construir de forma que una secuencia de ADN que codifique parte de una cadena de la inmunoglobulina humana esté fusionada con una secuencia de ADN que codifique para una secuencia de aminoácido no inmunoglobulínica tal como un efector de polipéptido o una molécula reportera.

Preferiblemente, en un anticuerpo humanizado, los dominios variables tanto en las cadenas pesadas y como en las cadenas ligeras humanas se han manipulado mediante uno o más reemplazos en la CDR. Es posible usar las seis CDR, o diversas combinaciones de menos de las seis CDR. Preferiblemente, todas las seis CDR están reemplazadas. Es posible el reemplazar las CDR solo en la cadena pesada humana, empleando como cadena ligera la cadena ligera no modificada del anticuerpo aceptor humano. De forma alternativa, se puede seleccionar una cadena ligera compatible a partir de otro anticuerpo humano recurriendo a las bases de datos de anticuerpos

convencionales. El resto del anticuerpo manipulado se puede derivar de cualquier inmunoglobulina humana aceptora adecuada.

Así pues el anticuerpo humanizado manipulado tiene preferentemente la estructura de un anticuerpo humano natural o un fragmento del mismo y posee la combinación de propiedades requeridas para el uso terapéutico efectivo.

5 Se entenderá por parte de los especialistas en la técnica que un anticuerpo manipulado puede modificarse además mediante cambios en los aminoácidos de dominio variable sin afectar necesariamente a la especificidad y alta afinidad del anticuerpo dador (es decir, un análogo). Se anticipa que los aminoácidos de cadena pesada y ligera pueden estar sustituidos por otros aminoácidos bien en las estructuras de dominio variable o bien en las CDR o bien en ambas.

10 Además, la región constante se puede alterar para mejorar o reducir las propiedades selectivas de las moléculas de la presente invención y divulgación. Por ejemplo, dimerización, unión a receptores Fc, o la capacidad de unir y activar complemento (véase, por ejemplo, Angal y col., Mol. Immunol, 30:105 - 108 (1993), Xu y col., J. Biol. Chem, 269: 3469-3474 (1994), Winter y col., EP 307, 434-B).

15 Un anticuerpo alterado que es un anticuerpo quimérico difiere de los anticuerpos humanizados descritos anteriormente por proporcionar todas las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo dador no humano completas, incluyendo las regiones estructurales, junto con las regiones constantes de la inmunoglobulina a partir de otras especies, preferiblemente seres humanos para ambas cadenas.

20 Preferiblemente, las secuencias de la cadena ligera y/o pesada variables y de las CDR de mAbs dadores adecuados y sus secuencias de ácido nucleico de codificación, se emplean en la construcción de anticuerpos alterados, preferiblemente anticuerpos humanizados, de la presente invención y divulgación, mediante el siguiente procedimiento. Se pueden emplear también la misma o similares técnicas para generar otras realizaciones de la presente invención o divulgación.

25 Se clona de forma convencional un híbrido que produce un mAb dador seleccionado y se obtiene el ADN de sus regiones variables de cadena pesada y ligera por técnicas conocidas por un especialista en la técnica, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook y col., (Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)). Las regiones pesadas y ligeras variables que contienen al menos las regiones que codifican las CDR y aquellas partes de las regiones estructurales del dominio variable ligero y/o pesado del mAb aceptor requeridas para conservar la especificidad de unión por el mAb dador, así como también las partes derivadas de la inmunoglobulina restantes de la cadena de anticuerpo derivadas de una inmunoglobulina humana se obtienen empleando cebadores de polinucleótido y transcriptasa inversa. Las regiones que codifican para las CDR se identifican empleando una base de datos conocida y por comparación con otros anticuerpos.

30 Luego se puede preparar un anticuerpo quimérico de ratón/humano y ensayar la capacidad de unión. Un anticuerpo quimérico tal contiene todas las regiones V_H y V_L del anticuerpo dador no humano completas, en asociación con las regiones constantes de Ig humanas para ambas cadenas.

35 Las regiones estructurales homólogas de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano se pueden identificar empleando bases de datos informáticas, por ejemplo, la base de datos KABAT® y se seleccionará un anticuerpo humano que tenga homología respecto al anticuerpo dador como el anticuerpo aceptor. Se puede diseñar una región estructural variable de cadena ligera adecuada de forma similar.

40 Se puede derivar un anticuerpo humanizado del anticuerpo quimérico, o preferiblemente, hacerlo de forma sintética mediante la inserción de las regiones que codifican para las CDR del mAb dador a partir de cadenas pesadas y ligeras de forma apropiada dentro de la estructura de cadena pesada y ligera seleccionada. De forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo humanizado empleando técnicas de mutagénesis convencionales. Así pues, el anticuerpo humanizado resultante contiene regiones estructurales humanas y regiones que codifican para las CDR del mAb dador. Puede haber manipulación consiguiente de los residuos estructurales. El anticuerpo humanizado resultante se puede expresar en células huésped recombinantes, por ejemplo, COS, CHO o células del mieloma.

45 Se produce un vector de expresión convencional o un plásmido recombinante mediante la colocación de estas secuencias de codificación para el anticuerpo en asociación operativa con las secuencias de control regulatorio convencionales capaces de controlar la replicación y la expresión en, y/o la secreción desde, una célula huésped. Las secuencias regulatorias incluyen secuencias promotoras, por ejemplo, promotor CMV y las secuencias señal, que se pueden derivar de otros anticuerpos conocidos. De forma similar se puede producir un segundo vector de expresión que tenga una secuencia de ADN que codifique una cadena ligera o pesada de anticuerpo complementario. Preferiblemente este segundo vector de expresión es idéntico al primero salvo porque las secuencias de codificación y los marcadores seleccionables están involucrados, de forma que aseguren en tanto sea posible que cada cadena de polipéptido se exprese funcionalmente. De forma alternativa, las secuencias de codificación de la cadena pesada y ligera para el anticuerpo alterado pueden residir en un vector único.

50 Se co-transfecta una célula huésped seleccionada mediante técnicas convencionales con ambos vectores primero y segundo (o simplemente se transfecta mediante un vector único) para crear la célula huésped transfectada de la divulgación que comprende las cadenas tanto ligeras como pesadas recombinantes o sintéticas. La célula transfectada se cultiva luego por técnicas convencionales para producir el anticuerpo manipulado de la invención o divulgación. El anticuerpo humanizado que incluye la asociación de ambas de la cadena pesada y/o de la cadena ligera recombinantes se somete a seguimiento en el cultivo mediante ensayo adecuado, tal como ELISA o RIA. Se pueden emplear técnicas convencionales similares para construir otros anticuerpos y moléculas alterados.

60 Un experto en la técnica puede seleccionar vectores adecuados para las etapas de clonación y subclonación empleadas en los procedimientos y en la construcción de las composiciones de esta invención o divulgación. Se

pueden emplear por ejemplo, las series pUC convencionales de vectores de clonación. Un vector, el pUC19, está comercialmente disponible de suministradores, tales como Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido) o Pharmacia (Uppsala, Suecia). De forma adicional cualquier vector que sea capaz de replicarse fácilmente tiene una abundancia de sitios de clonación y genes seleccionables (por ejemplo, de resistencia a antibióticos) y que sea fácilmente manipulable puede emplearse para la clonación. Así pues, la selección del vector de clonación no es un factor limitante.

De forma similar, los vectores empleados para la expresión de los anticuerpos se pueden seleccionar por un especialista en la técnica a partir de cualquier vector convencional. Los vectores también contienen secuencias regulatorias seleccionadas (tales como promotores CMV) que dirigen la replicación y la expresión de las secuencias de ADN heterólogas en las células huésped seleccionadas. Estos vectores contienen las secuencias de ADN anteriormente descritas que codifican para la región de codificación del anticuerpo o de la inmunoglobulina alterada. Además, los vectores pueden incorporar las secuencias de inmunoglobulina seleccionadas modificadas mediante la inserción de sitios de restricción deseables para la facilidad de manipulación.

Los vectores de expresión pueden caracterizarse también por genes adecuados para la amplificación de la expresión de secuencias de ADN heterólogas, por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa de mamíferos (DHFR). Otras secuencias vectoriales preferibles incluyen una secuencia de señal de poli A, tal como la hormona de crecimiento bovino (BGH) y la secuencia promotora de la betaglobina (betaglopro). Los vectores de expresión útiles en el presente documento se pueden sintetizar por técnicas bien conocidas por los especialistas en la técnica.

Los componentes de tales vectores, por ejemplo replicones, genes de selección, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares se pueden obtener a partir de fuentes comerciales o naturales o se pueden sintetizar por procedimientos conocidos por el uso en dirigir la expresión y/o la secreción del producto del ADN recombinante en un huésped seleccionado. Se pueden seleccionar para este propósito otros vectores de expresión apropiados de los que se conocen numerosos tipos en la técnica para expresión en mamíferos, bacterias, insectos, levaduras y hongos.

La presente divulgación también comprende una línea celular transfectada con un plásmido recombinante que contiene las secuencias de codificación de los anticuerpos o de las moléculas de inmunoglobulina alterada de los mismos. Son también convencionales las células huésped útiles para la clonación y otras manipulaciones de estos vectores de clonación. Sin embargo, lo más deseablemente, las células de diversas cepas de *E. coli* se usan para la replicación de los vectores de clonación y otras etapas en la construcción de anticuerpos alterados de la presente invención o divulgación.

Las células o líneas celulares huésped adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención o divulgación son preferiblemente células de mamíferos tales como NS0, Sp2/0, CHO, COS, una célula fibroblástica (por ejemplo, 3T3) y células de mieloma y más preferiblemente una célula CHO o una célula de mieloma. Se pueden emplear células humanas, permitiendo así a la molécula modificarse con patrones de glucosilación humanos. De forma alternativa, se pueden emplear otras líneas celulares eucarióticas. La selección de las células huésped de mamíferos adecuadas y los procedimientos para la transformación, cultivo, amplificación, seguimiento y producción y purificación del producto se conocen en la técnica. Véase por ejemplo, Sambrook y col., citado anteriormente.

Las células bacterianas pueden demostrar ser útiles como células huésped adecuadas para la expresión de los Fabs recombinantes de la presente invención (véase, por ejemplo, Plücker, A., Immunol. Rev., 130: 151 - 188 (1992)). Sin embargo, debido a la tendencia de las proteínas expresadas en células bacterianas a estar en una forma no plegada o plegada de forma inapropiada o en una forma no glucosilada, cualquier Fab recombinante producido en una célula bacteriana tendría que someterse a seguimiento en cuanto a la conservación de la capacidad de unión al antígeno. Si la molécula expresada por la célula bacteriana se produjese en una forma plegada apropiadamente, esa célula bacteriana sería un huésped deseable. Por ejemplo, diversas cepas de *E. coli* empleadas para la expresión se conocen bien como células huésped en el campo de la biotecnología. Se pueden emplear en el presente procedimiento también diversas cepas de *B. subtilis*, *Streptomyces*, otros bacilos y similares.

Cuando se desee, se encuentran también disponibles cepas de células de levadura conocidas por los especialistas en la técnica como células huésped, así como también células de insectos, por ejemplo de *Drosophila* y *Lepidoptera* y sistemas de expresión viral. Véase, por ejemplo Miller y col., Genetic Engineering, 8: 277 - 298, Plenum Press (1986) y las referencias citadas en la misma.

Los procedimientos generales por los que se pueden construir los vectores, los procedimientos de transfección requeridos para producir las células huésped de la invención y los procedimientos de cultivo necesarios para producir los anticuerpos alterados de la invención o divulgación a partir de la mencionada célula huésped son todas técnicas convencionales. Análogamente, una vez producidos, los anticuerpos de la invención o divulgación se pueden purificar a partir de los contenidos de cultivos celulares de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, las columnas de afinidad, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel y similares. Tales técnicas están dentro de la habilidad en la técnica. Por ejemplo, la preparación de anticuerpos alterados se describe en los documentos WO 99/58679 y WO 96/16990.

Aún otro procedimiento de expresión de los anticuerpos puede emplear la expresión en un animal transgénico, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 4.873.316. Esto se refiere a un sistema de expresión que emplea el promotor de la caseína animal que cuando se incorpora transgénicamente en un mamífero permite que la hembra produzca la proteína recombinante deseada en su leche.

Una vez expresado por el procedimiento deseado, se examina después en actividad *in vitro* mediante el empleo de un ensayo apropiado. Actualmente, se emplean los formatos de ensayo ELISA convencionales para valorar la unión cualitativa y cuantitativa del anticuerpo a la MAG. De forma adicional, se pueden emplear otros ensayos *in vitro* para verificar la eficacia de la neutralización antes de los subsiguientes estudios clínicos en seres humanos para evaluar

la persistencia del anticuerpo en el cuerpo a pesar de los mecanismos de eliminación usuales.

Los agentes terapéuticos de esta invención o discusión se pueden administrar como un profiláctico o tras daño, o de otra forma necesaria. La dosis y duración del tratamiento se relaciona con la duración relativa de las moléculas de la presente invención o divulgación en la circulación humana y puede ser ajustada por un experto en la técnica dependiendo de la afección a tratar y de la salud general del paciente.

El modo de administración del agente terapéutico de la invención puede ser cualquier ruta adecuada que libere el agente en el huésped. Los antagonistas y anticuerpos y composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, de forma subcutánea, intramuscular, intravenosa o intranasal.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva del antagonista o anticuerpo de la invención como un ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el agente profiláctico de la invención o divulgación, se prefiere una suspensión o una solución acuosa que contenga el anticuerpo manipulado, preferiblemente tamponada a pH fisiológico, en una forma fácil para inyección. Las composiciones para administración parenteral comprenderán comúnmente una solución del antagonista o anticuerpo de la invención o un cóctel de los mismos disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede emplear una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo solución salina al 0,9%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y están por lo general exentas de materia particulada. Se pueden esterilizar estas soluciones mediante técnicas de esterilización bien conocidas convencionales (por ejemplo por filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requieren para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponantes, etc. La concentración del antagonista o anticuerpo de la invención o divulgación en tal formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,5%, normalmente en o al menos aproximadamente el 1% hasta el 15 o el 20% en peso como mucho y se seleccionará en primer lugar en base a volúmenes de fluido, viscosidades etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Así pues, se podría preparar una composición farmacéutica de la invención o divulgación para la inyección intramuscular para contener 1 ml de agua estéril tamponada y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg, por ejemplo de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg o más preferiblemente, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, de un antagonista o anticuerpo de la invención o divulgación. De forma similar, se podría preparar una composición farmacéutica de la invención o divulgación para infusión intravenosa para que contuviese hasta aproximadamente 250 ml de solución de Ringer estéril y aproximadamente de 1 a aproximadamente 30 y preferiblemente de 5 mg a aproximadamente 25 mg de un anticuerpo manipulado de la invención o divulgación. Los procedimientos actuales para la preparación de composiciones administrables de forma parenteral se conocen bien o se harán aparentes para los especialistas en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Se prefiere que el agente terapéutico de la invención o divulgación, cuando se encuentre en una preparación farmacéutica, esté presente en formas de dosis unitarias. La dosis terapéuticamente efectiva apropiada se puede determinar fácilmente por los especialistas en la técnica. Para tratar de forma efectiva la apoplejía y otras enfermedades neurológicas en un ser humano, se debería administrar parenteralmente una dosis de hasta 700 mg por 70 kg de peso corporal de un antagonista o anticuerpo de esta invención o divulgación, preferiblemente de forma i.v. o i.m. (intramuscularmente). La mencionada dosis puede, si fuese necesario, repetirse a intervalos de tiempo apropiados seleccionados como adecuados por un facultativo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden liofilizar para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de usar. Esta técnica ha mostrado ser efectiva con inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG de la presente invención o un fragmento funcional del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento o profilaxis de la apoplejía. Aún en un aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-MAG de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para inhibir neurodegeneración y/o para promover la recuperación funcional en un paciente humano que sufre de, o está en riesgo de desarrollar, una apoplejía.

Ejemplo1 – anticuerpo Anti-MAG en modelo de apoplejía

Materiales y procedimientos

Anticuerpo monoclonal Anti-MAG

El anticuerpo monoclonal anti – MAG era anticuerpo MAG anti – pollo de ratón MAB 1567 obtenido de Chemicon. El anticuerpo tiene las siguientes características:

Antígeno: glucoproteína asociada a la mielina (ser humano, ratón, rata, bovino, pollo, rana).

Isotipo: IgG1

Capacidad neutralizante: véase De Bellard y col (1996) Mol. Cell. Neurosci. 7, 89 - 101; Tang y col., (1997) Mol. Cell. Neurosci. 9, 333 - 346; Torigoe K y Lundborg G (1997) *Exp. Neurology* 150, 254 - 262.

Mab IgG1 de control se compró de R + D Systems.

Canulación ventricular intracerebral (para estudio 1 solamente)

En anestesia de halotano se situaron cánulas ventriculares intracerebrales (i. c. v.) en el ventrículo cerebral lateral izquierdo (coordenadas: 1,6 mm desde la línea central, 0,8 mm caudal desde el bregma, 4,1 mm desde la superficie del cráneo, barra incisiva 3,2 mm por debajo de cero según Paxinos y Watson, 1986). Se enjaularon todas las ratas individualmente evitando daño a la guía o cánula artificial. 7 días después de la cirugía, se verificó la correcta situación de la cánula mediante una respuesta intensa a la bebida a Angiotensina II (100ng, Simpson y col., 1978). Nueve días después, los animales experimentaron una isquemia cerebral.

Isquemia cerebral focal transitoria

Se indujo isquemia cerebral focal transitoria (90 min) en machos de rata Sprague Dawley, pesando cada uno entre 300 – 350 g. Se anestesiaron los animales inicialmente con una mezcla de halotano al 5%, óxido nitroso al 60% y oxígeno al 30%, situada en una mascarilla y se mantuvo la anestesia posteriormente a halotano al 1,5%. La oclusión de la arteria cerebral central (MCAO) se llevó a cabo usando la técnica de hilo intraluminal como describió previamente (Zea Longa y col. 1989). Los animales se mantuvieron normotérmicos durante todo el procedimiento quirúrgico, se les permitió recuperarse durante 1 hora en un incubador, antes de que se enjaularan individualmente. Solamente aquellos animales con una puntuación neurológica de 3 1 hora después de la oclusión se incluyeron en el estudio (según se valoró usando un sistema de puntuación de 5 puntos: 0, sin déficit; 1, reflejo contralateral; 2 agarre debilitado; 3, moviéndose en círculos; 4, inmóviles; 5, muerte). Se mantuvieron los animales durante hasta 1 semana tiempo al que se sacrificaron los animales por perfusión transcárdica de solución salina al 0,9% seguida de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 100 mM. Después se fijaron los cerebros en paraformaldehído al 4% a 4°C durante 48 horas tiempo al que se retiraron de los cráneos y se cortaron en bloques de 2 mm usando una matriz de cerebro de rata. Después las secciones de 2 mm se incrustaron en parafina usando un procesador de tejidos Shandon Citadel 1000, se cortaron en secciones de 6 µm usando un microtomo y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Después las secciones se trataron para tinción rápida con violeta de cresilo (CFV).

Régimen de dosificación

Anticuerpo monoclonal anti-MAG y anticuerpo de control isotipo IgG1 de ratón se dializaron frente a cloruro sódico estéril al 0,9% durante una noche y se concentraron adecuadamente.

Estudio 1: Los animales recibieron 2,5 µg de anti-MAGmab o 2,5 µg de IgG de ratón i. c. v. 1, 24 y 72 horas después MCAO de (5 µl por dosis).

Estudio 2: Los animales recibieron 200 µg de anti-MAG mab o 200 µg de IgG de ratón i. v. 1 y 24 horas después de MCAO.

El investigador no conocía la identidad de cada solución de dosificación.

Valoración neurológica

Antes de la inducción de la isquemia cerebral, las ratas para el estudio 1 recibieron adiestramiento en caminar sobre una barra y ensayo de etiqueta pegadiza. Los animales que no alcanzaban los criterios en ambos ensayos se excluían para estudio adicional. Después del adiestramiento, el resto de los animales se clasificaron según el comportamiento en dos grupos equilibrados. A lo largo de toda la valoración neurológica, los investigadores no conocían el grupo de tratamiento del animal.

Ensayo de etiqueta pegadiza bilateral

El ensayo de la etiqueta pegadiza bilateral (Schallert y col., Pharmacology Biochemistry and Behaviour 16: 455-462, (1983)) se utilizó valorando la desviación contralateral de negligencia/ipsilateral. Esta extinción táctil de modelos se ha observado en pacientes humanos con apoplejía (Rose y col., 1994). Este ensayo se ha descrito en detalle anteriormente (Hunter y col., Neuropharmacology 39: 806-816 (2000); Virley y col., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 20: 563 - 582 (2000)). Brevemente, una etiqueta de papel redonda y pegadiza se situó firmemente alrededor de un área sin pelo de las patas delanteras con igual presión con el fin de que tenga carácter aleatorio (izquierda, derecha). Las sesiones de adiestramiento se llevaron a cabo durante 6 días antes de MCAO, los datos del día 6 se utilizaron como la línea de base antes de la operación (día 0). Se les dio a los animales dos tentativas 24 y 7 días después de MCAO, los datos representan una media de las dos tentativas. La latencia a establecer contacto y retirar las etiquetas se registró y se analizó utilizando el ensayo logrank (Cox, J. Royal Statistical Society B 34: 187 - 220 (1972)).

Caminar sobre una barra

Caminar sobre una barra se utilizó como una medida de coordinación del miembro posterior y el miembro anterior por medio de la distancia caminada a través de una barra elevada de 100 cm (2,3 de diámetro, a 48 cm del suelo) como previamente describieron en detalle (Virley y col., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 20: 563-582 (2000)). Se adiestró a las ratas para cruzar la barra desde el principio al final. Para el ensayo, se les daba a las ratas dos tentativas 24 h y 7 d después de MCAO, los datos representan una media de las dos tentativas. El análisis estadístico fue ANOVA seguido de la prueba de t de Student.

La puntuación neurológica de 27 puntos (Estudio 1)

Este estudio consta de una batería de ensayos valorando el estado neurológico que incluye, situación de la pata, alcance visual de la pata delantera, barra horizontal, rotación contralateral, plano inclinado, reflejo correcto, reflejo contralateral, condición de movilidad y general, como describió previamente (Hunter y col. Neuropharmacology 39: 806 - 816 (2000)) con la adición de las medidas de la fuerza de agarre (puntuaciones 2 para agarre miembro anterior

derecho bueno, 1 para agarre débil). Puntuación total = 27 para un animal normal.

Para el estudio 2 este ensayo se modificó posteriormente: fuerza de agarre – normal puntúa 3, buena - 2, débil - 1, muy débil - 0; motilidad- normal puntúa 4, excelente - 3, muy buena - 2, buena - 1, débil - 0.; condición general – normal puntúa 4, excelente – 3, muy buena – 2, buena – 1, débil – 0; movimiento en círculos - ninguno puntúa 5, hacia un lado con apoyo puntúa 4, círculo amplio – 3, medio círculo – 2, pequeño círculo – 1, como un trompo – 0). La puntuación total para un animal normal = 32.

En ambos estudios los animales se ensayaron 1, 24, 48 y 7 d después de MCAO, un animal normal saludable puntúa 27 y 32 respectivamente. Los datos se presentan como valores medios, el análisis estadístico fue Kruskal Wallis ANOVA.

10 Valoración de lesiones

Estudio 1- para cada animal, las áreas de lesión se valoraron en secciones de tres niveles predeterminados en el cerebro (0, -2,0 y -6,0 mm desde el Bregma respectivamente) Se valoró el daño neuronal utilizando tinción rápida con violeta de cresilo y el área de daño se midió usando un paquete de formación de imágenes Optimas 6.1. Los datos se expresan como área media (mm^2) \pm eem.

15 Estudio 2- para cada animal, las áreas de lesión se valoraron en secciones de siete niveles predeterminados en el cerebro (+3 mm a -8 mm w. r. t. Bregma). Se valoró el daño neuronal utilizando tinción rápida con violeta de cresilo y el área de daño se midió usando un paquete de formación de imágenes Optimas 6.1. Los datos se expresan como área media (mm^2) \pm eem.

Resultados

20 Estudio 1 – administración ventricular intracerebral (i. c. v.) de anti-MAG mab

Puntuación neurológica

Una hora después de MCAO los animales en ambos grupos de tratamientos mostraron un empeoramiento marcado en la puntuación neurológica (puntuación media 12 en cada grupo). No había diferencia significativa entre grupos en este momento. Sin embargo 24 (p = 0,02), 48 (p = 0,005) h y 7 d (p = 0,006) después de MCAO los animales tratados con anti-MAG mab (2,5 μg , 1, 24 y 72 h después de MCAO) mostraron una puntuación neurológica total mejorada significativamente comparada con los tratados con IgG de control. Las puntuaciones neurológicas medias 24, 48 h y 7 d después de MCAO en el grupo tratado con IgG₁ eran 15, 14 y 18 respectivamente comparadas con 19,5, 21,5 y 22 en los animales tratados con anti-MAG mab. En un análisis adicional de las conductas individuales que comprendían la puntuación total, esta mejora significativa se atribuyó principalmente al comportamiento mejorado en los siguientes ensayos: colocación de la pata (24 h, p = 0,045; 48 h, p = 0,016; 7 d, p = 0,008), fuerza de agarre (24 h, p = 0,049; 48 h, p = 0,0495; 7 d, p = 0,243), motilidad (24 h, p = 0,199; 48 h, p = 0,012; 7 d, p = 0,067), barra horizontal (24 h, p = 0,065; 48 h, p = 0,005; 7 d, p = 0,016), plano inclinado (24 h, p = 0,006; 48 h, p = 0,006; 7 d, p = 0,169), alcance visual de la pata delantera (48 h, p = 0,049, 7 d, p = 0,049) y el grado de hacer círculos (24 h, p = 0,417; 48 h, p = 0,034; 7 d, p = 0,183).

35 Caminar sobre la barra

Antes de la cirugía se adiestró a todos los animales para cruzar la barra (100 cm). Veinticuatro horas después de la cirugía había un empeoramiento significativo en la distancia caminada sobre la barra tanto en los animales tratados con anti-MAG (50 \pm 18 cm) como en los animales tratados con IgG₁ (22 \pm 14 cm) comparada con los valores antes de la operación. Aunque no significativo, los animales tratados con anti-MAG mostraron una mejora marcada sobre los animales tratados con IgG₁ en que caminaron dos veces la distancia de los animales tratados con IgG₁ 24 h después de tMCAO. Sin embargo, siete días después de la cirugía, mientras los animales tratados con IgG permanecían empeorados significativamente comparados con la línea de base (55 \pm 15 cm; p = 0,005). Sin embargo, en contraste 7 d después de MCAO, en los animales tratados con anti-MAG mab (2,5 μg 1, 24 y 72 h, i.c.v después de MCAO) el comportamiento no era significativamente diferente de la línea de base (75 \pm 15 cm; p= 0,07). Estos datos muestran que el tratamiento de anti-MAG mab aceleraba la recuperación de esta tarea de caminar por la barra comparado con los controles tratados con IgG₁ de ratón.

Etiqueta pegadiza

Antes de la cirugía, los animales en cada uno de los grupos de tratamiento tocaban y retiraban rápidamente las etiquetas de cada pata delantera, no había diferencia significativa en los grupos antes del tratamiento (tabla 1). Veinticuatro horas y 7 d después de MCAO la latencia a tocar la pata izquierda en cada uno de los grupos de tratamiento permanecía relativamente inalterada, mientras que la de la pata derecha se había incrementado marcadamente. Sin embargo no había diferencias significativas entre los tiempos de retirada en animales tratados con anti-MAG e IgG₁. Además 24 h después de MCAO, la latencia a la retirada de tanto la pata delantera izquierda como de la derecha se incrementaba significativamente en ambos grupos de tratamiento comparados con la línea de base, sin embargo, en animales tratados con anti-MAG la latencia de la retirada de la pata izquierda era significativamente más corta que la de los animales tratados con IgG₁ (p = 0,03). Existió también una tendencia a reducir la latencia a la retirada de la pata derecha en los animales tratados con anti-MAG comparados con los tratados con IgG₁ (p = 0,08) (tabla 1). A los 7 d había algún grado de recuperación en los animales tratados con IgG₁ porque la latencia a los tiempos de retirada para cada pata se reducían comparados con aquellos a las 24 h (tabla 1) Estos datos sugieren que el tratamiento de ratas con anti-MAG mab acelera la recuperación en este ensayo de etiqueta pegadiza después de tMCAO.

Tabla 1- datos de etiqueta pegadiza

Día	Tratamiento	Tiempo de contacto (s)		Tiempo de retirada (s)	
		(media ± eem)		(media ± eem)	
		Pata delantera izquierda	Pata derecha delantera	Para izquierda delantera	Para derecha delantera
0	Anti-MAG	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,5	12 ± 2	12 ± 2
0	IgG ₁	3,3 ± 0,6	4,2 ± 0,7	10 ± 1	9 ± 1
1	Anti-MAG	5,9 ± 3,7	109,6 ± 27,5	*61 ± 26	96 ± 26
1	IgG ₁	3,6 ± 0,5	71,8 ± 31,7	130 ± 21	156 ± 19
7	Anti-MAG	3,8 ± 1	36,4 ± 10,2	54 ± 23	80 ± 30
7	IgG ₁	2,8 ± 0,3	64 ± 28	23 ± 8	87 ± 20

(*p = 0,03 Anti-MAG frente a IgG₁ usando la prueba de logrank).

Mediciones del área de lesión

- 5 La administración de anti-MAG mab i.c.v, redujo significativamente el área de lesión en dos de los tres niveles del cerebro examinados comparada con los animales tratados con iguales cantidades de IgG₁ de ratón cuando se examinan 7 días después de tMCAO (tabla 2).

Tabla 2

Tratamiento	Area media de lesión ± eem (mm ²) 7d después de tMCAO		
	0 mm wrt Bregma	-2 mm wrt Bregma	-6 mm wrt Bregma
Anti-MAG mab (n=8)	*9 ± 2	*4 ± 3	*3 ± 1
IgG ₁ de ratón (n=9)	14 ± 1	12 ± 1	5 ± 1

(*p = 0,02, *p = 0,03, *p = 0,06, anti-MAG frente a IgG₁, Prueba de t de Student de una vía, desapareada).

Estudio 2 – administración intravenosa (i. v.)

Puntuación neurológica

- 10 Una y 24 horas después de MCAO los animales de ambos grupos mostraban empeoramiento marcado en la puntuación neurológica. No había diferencia significativa entre grupos en este momento, las puntuaciones medias 24 h después de tratamiento con anti-MAG mab e IgG₁ eran 20 y 18 respectivamente (p = 0,5). Cuarenta y ocho horas después de MCAO, los animales tratados con anti-MAG mab (200 µg, i.v. 1 y 24 h después de MCAO) mostraban una mejora significativa en la disposición de la pata (p = 0,048) y fuerza de agarre (p = 0,033). Siete días después del comienzo de la isquemia cerebral los animales tratados con anti-MAG mab continuaban mejorando (disposición de la pata p = 0,041; fuerza de agarre, p = 0,048; motilidad, p = 0,05) y mostraban una mejora significativa en la puntuación total neurológica (puntuación media 25 comparada con los tratados con IgG₁ de ratón (puntuación media 23, p = 0,047).

Mediciones del área de la lesión

- 20 Cuando se administra i.v. el anticuerpo anti-MAG MCAO reducía significativamente el área de la lesión en 5 de los 7 niveles de cerebro predeterminados (+3 a -8 mm w.r.t. Bregma) comparada con los controles de isotipo, cuando se examinaron 7 d después de MCAO.

Nivel de cerebro wrt Bregma	Area media de lesión ± EEM (mm ²) Tratado con – Anti- MAG	Area de lesión media ± EEM (mm ²) Tratado con – IgG ₁ de ratón
3 mm	*0,38 ± 0,27	1,77 ± 0,45
1 mm	*5,82 ± 1,65	9,627 ± 1,14
-1 mm	8,98 ± 2,58	12,07 ± 1,57

-2 mm	7,28 ± 1,92	10,04 ± 1,87
-4 mm	*5,57 ± 1,06	10,38 ± 1,39
-6 mm	*1,36 ± 0,51	4,43 ± 1,95
-8 mm	*0,27 ± 0,27	1,93 ± 0,56
* p < 0,05 – prueba de t de Student, desapareada de una vía.		

Conclusiones

Se administró un anticuerpo monoclonal anti-MAG bien directamente en el CSF o intravenosamente después de oclusión transitoria de la arteria cerebral central en la rata, en ambos casos se reducía el área de muerte celular y mejoraba la recuperación funcional comparada con los animales tratados con control. El grado de neuroprotección visto en estos estudios sugiere que este efecto no se puede atribuir a la regeneración axonal ya que esto no daría como resultado una moderación neuronal. La mejora en la recuperación funcional vista en 24 y 48 h después de MCAO probablemente refleja el grado de neuroprotección ofrecido por este anticuerpo comparado con los animales tratados con control. Sin embargo, con el tiempo los animales parecen mejorar posteriormente, sugiriendo que el bloqueo de la actividad de MAG puede también potenciar la recuperación funcional con el tiempo.

Los estudios presentados aquí evidencian que bloqueando las acciones de MAG se proporciona tanto neuroprotección como recuperación funcional potenciada en un modelo de rata de apoplejía y por lo tanto los anticuerpos anti-MAG proporcionan agentes terapéuticos funcionales para neuroprotección aguda y/o para la promoción de recuperación funcional que sigue a apoplejía. Las bajas cantidades de anticuerpo administradas por vía i. v. y los niveles bajos en suero del anticuerpo resultantes, a su vez sugerirían concentraciones extremadamente bajas de anticuerpo en el cerebro debido a las restricciones de la barrera sangre - cerebro para la penetración de anticuerpo. Sin embargo, sorprendentemente, esto todavía proporciona tanto neuroprotección como recuperación funcional potenciada que se observa. Los anticuerpos anti-MAG también tienen uso potencial en el tratamiento de otros trastornos neurológicos donde la degeneración de células y o fibras nerviosas es aparente tal como lesión de la espina dorsal, lesión del cerebro traumática, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, demencias fronto-temporales (tauopatías), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple. En los ejemplos que siguen las CDR (regiones determinantes complementarias) de anticuerpos quiméricos y humanizados descritos es esta memoria descriptiva son las CDR del anticuerpo del ejemplo 1.

Ejemplo 2 – anticuerpo quimérico

Los anticuerpos alterados incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden regiones variables que derivan de una especie unidas a regiones constantes de otra especie. Los ejemplos de cadenas de inmunoglobulina de anti-MAG quiméricas de ratón-ser humano de la invención se proporcionan en las figuras 1, 2 y 3. Las quimeras de ratón-ser humano que utilizan las regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD humanas se pueden producir, como muchas quimeras asociando las regiones variables de ratón con regiones constantes de cadena pesada o ligera de especies no humanas.

La figura 1 (SEC ID N.º: 27) proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica en la que la región variable de cadena pesada de anti-MAG murina se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con una forma alterada de la región constante de IgG1 humana, en la que los residuos Kabat 248 y 250 se han mutado a alanina con el fin de desactivar las funciones efectoras de unión a FcγRI y proteína C1q complementaria (Duncan A. R. y Winter, G Localization of the C1q binding site on antibodies by surface scanning. Nature 332, 738 - 740, 1988. Duncan A. R., Woolf, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R. y Winter, G. Localisation of the binding site for human FcR1 on IgG. Nature 332, 563 - 564, 1988). Dichas mutaciones se fabrican opcionalmente con el fin de personalizar las propiedades de un anticuerpo alterado logrando un efecto terapéutico particular – por ejemplo unirse a y bloquear la función de un antígeno sin activar los mecanismos efectoras líticos.

La figura 2 (SEC ID N.º: 28) proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica en la que la región variable de de cadena ligera de anti-MAG murina se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con la región constante kappa humana.

De manera similar, las regiones variables anti-MAG se pueden asociar con regiones constantes de inmunoglobulina que carecen de mutaciones que incapaciten las funciones efectoras. La figura 3 (SEC ID N.º: 29) proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica en la que la región variable de la cadena pesada de anti-MAG murina se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con una forma de tipo salvaje de la región constante de IgG1 humana.

A partir de la información proporcionada en las figuras 1 a 3, las inserciones de ADNc que codifican estas cadenas quiméricas se pueden preparar mediante técnicas de biología molecular estándar bien conocidas por los expertos en la técnica. Brevemente, el código genético se utiliza identificando codones de nucleótidos que codifican los aminoácidos deseados, creando una secuencia de ADNc virtual que codifica la proteína quimérica. Si se desea que el inserto de ADNc se exprese en un organismo particular, después se pueden seleccionar los codones favorecidos en particular según las desviaciones de uso del codón conocido. Después la secuencia de nucleótidos deseada se

sintetiza mediante medios de amplificación de PCR de un molde que comprende la superposición de oligonucleótidos sintéticos que, como un grupo de clones que representan las regiones de superposición del genoma, representan la secuencia deseada. El producto resultante se puede también modificar mediante PCR o mutagénesis ligando los sitios de restricción con el fin de facilitar la clonación en un plásmido adecuado para expresión o posteriores manipulaciones.

Ejemplo 3 – anticuerpo quimérico se une a MAG de rata en ELISA

Un anticuerpo quimérico anti – MAG que contiene las CDR de cadena pesada y ligera de la invención se produjo mediante transfección transitoria de células CHO. Para esto, se utilizó el reactivo de transfección Transfat (promega; E2431) y se llevaron a cabo las transfecciones según las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, $\sim 10^6$ de células CHO se sembraron por pocillo de placas de cultivo de 6 pocillos. Al día siguiente ADN de vector de expresión de mamíferos que codifica la cadena pesada o ligera adecuada se mezcló en relación 1:1 (ADN total 5 μg) en medio (Optimem 1 con Glutamax; Gibco n.º: 51985 – 026). Se añadió el reactivo de transfección Transfat y se transfirió la solución a pocillos con capas celulares confluentes. Después de 1 h a 37°C en el incubador de células, la mezcla ADN/Transfat se cubrió con 2 ml de medio Optimem y se dejó durante 48 – 72 h en el incubador. Se recogieron los sobrenadantes, se aclararon mediante centrifugación y se pasaron a través de filtros de 0,2 μm . La concentración de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo de células CHO se determinó mediante ELISA y se estimó que estaba alrededor de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para unión a MAG, se utilizó MAG – Fc de rata comercialmente disponible. Debido a la fusión con Fc de tipo humano anticuerpos quiméricos unidos no se podrían detectar usando anticuerpos secundarios de IgG anti-humana. En cambio, se utilizó anticuerpo específico de cadena ligera kappa anti-humano. La figura 4 muestra que este anticuerpo quimérico se une a MAG incluso a 1/64 de dilución. Un anticuerpo de tipo humano no relacionado y el sobrenadante del cultivo de las células transfectadas de forma fingida no generaron ninguna señal en este ensayo.

Procedimiento:

Placas de microtitulación de ELISA (Nunc Maxisorp) se recubrieron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de fusión (R&D systems; 538-MG) en PBS a 4°C durante una noche. Se lavaron las placas dos veces con PBS y después se bloquearon con PBS/BSA (1% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Los sobrenadantes del cultivo de las células CHO transfectadas transitoriamente se pasaron a través de filtros de 0,2 μm y se diluyeron en serie en PBS/BSA comenzando con el sobrenadante limpio a 1/64 de dilución. Las diluciones de las muestras se dejaron a TA durante 1 h. Después las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 (al 0,1% v/v). El anticuerpo de detección era conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera de cabra anti-humano kappa (Sigma A – 7164) diluido a 1/2000 en PBS/BSA. El anticuerpo de detección se incubó durante 1 h a TA y se lavaron las placas como antes. Se añadió la solución de sustrato (Sigma Fast OPD P-9187) y se incubó hasta que se detectó el desarrollo de un color adecuado y después se detuvo utilizando H_2SO_4 3 M. El desarrollo del color se leyó a 490 nm.

Ejemplo 4 – anticuerpos humanizados

Los anticuerpos alterados incluyen anticuerpos humanizados que comprenden regiones variables humanizadas unidas a regiones constantes humanas. Los ejemplos de cadenas de inmunoglobulina anti – MAG humanizadas de la invención se proporcionan en la figura 5. Se pueden producir los anticuerpos humanizados que usan regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD humanas.

La figura 5 (SEC ID N.º: 30) proporciona un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada en la que la región variable de la cadena pesada anti – MAG humanizada se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con una forma alterada de la región constante de IgG1 humana, en la que los residuos Kabat 248 y 250 se han mutado a alanina con el fin de desactivar las funciones efectoras de unión a Fc γ RI y proteína C1q complementaria (Duncan A. R. y Winter, G Localization of the C1q binding site on antibodies by surface scanning. Nature 332, 738 - 740, 1988. Duncan A. R., Woolf, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R. y Winter, G. Localisation of the binding site for human FcR1 on IgG. Nature 332, 563 - 564, 1988). Dichas mutaciones se realizan opcionalmente con el fin de personalizar las propiedades de un anticuerpo alterado logrando un efecto terapéutico particular – por ejemplo uniéndose a y bloqueando la función de un antígeno sin activar los mecanismos efectores líticos.

La figura 5 (SEC ID N.º: 31) también proporciona un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada en la que la región variable de la cadena ligera anti – MAG humanizada se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con la región constante kappa humana.

De manera similar, las regiones variables anti – MAG se pueden asociar con regiones constantes de inmunoglobulina que carecen de mutaciones desactivando las funciones del efector. La figura 5 (SEC ID N.º: 32) proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada en la que la región variable de la cadena pesada anti – MAG humanizada se asocia con una secuencia señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con una forma de tipo salvaje de la región constante de IgG1 humana.

A partir de la información proporcionada en la figura 5, las inserciones de ADNc que codifican estas cadenas humanizadas se pueden preparar mediante técnicas de biología molecular estándar bien conocidas por los expertos en la técnica. Brevemente, el código genético se utiliza identificando codones de nucleótidos que codifican los aminoácidos deseados, creando una secuencia de ADNc virtual que codifica la proteína. Si se desea que el inserto de ADNc se exprese en un organismo particular, después se pueden seleccionar los codones favorecidos en particular de acuerdo con las desviaciones de uso del codón conocido. Después la secuencia de nucleótidos deseada se sintetiza mediante medios de amplificación de PCR de un molde que comprende la superposición de oligonucleótidos sintéticos que, como un grupo de clones que representan las regiones de superposición del genoma, representan la secuencia deseada. El producto resultante se puede también modificar mediante PCR o mutagénesis ligando los sitios de restricción con el fin de facilitar la clonación en un plásmido adecuado para

expresión o posteriores manipulaciones.

Ejemplo 5: anticuerpos anti – MAG humanizados unidos a MAG humano y de rata en ELISA

1) Elisa de unión directa a proteína de fusión MAG – Fc de rata de cantidades normalizadas de sobrenadante de cultivo para 9 combinaciones de cadenas pesadas y ligeras humanizadas

5 Los anticuerpos anti – MAG humanizados que contienen las CDR de cadena ligera y pesada de la invención se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO. Para esto, se utilizó el reactivo de transfección (Promega; E2431) y las transfecciones se llevaron a cabo según las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, ~10⁶ de células CHO se sembraron por pocillo de placas de cultivo de 6 pocillos. Al día siguiente ADN de vector de expresión de mamíferos que codifica la cadena pesada o ligera adecuada se mezcló en relación 1:1 (ADN total 5 µg) en medio (Optimem 1 con Glutamax; Gibco n.º: 51985 – 026). Se añadió el reactivo de transfección Transfast y se transfirió la solución a pocillos con capas celulares confluentes. Después de 1 h a 37°C en el incubador de células, la mezcla ADN/Transfast se cubrió con 2 ml de medio Optimem y se dejó durante 48 – 72 h en el incubador. Se recogieron los sobrenadantes, se aclararon mediante centrifugación y se pasaron a través de filtros de 0,2 µm. Se produjeron 9 combinaciones de cadenas variables pesadas y ligeras de las secuencias mostradas en la tabla más adelante y las regiones constantes de cadenas pesadas de IgG1 eran funcionales según la SEC ID.

SEC ID N.º (regiones-V)	Descripción	Nombre alternativo
13	Vh humanizada	BVh1
14	Vh humanizada	BVh2
15	Vh humanizada	BVh3
16	VI humanizada	CVI1
17	VI humanizada	CVI2
18	VI humanizada	CVI3
19	VI humanizada	CVI4

La concentración de anticuerpos se determinó mediante ELISA y las cantidades de sobrenadante usadas en el ensayo se normalizaron hasta una concentración de partida de 250 o 500 ng/ml (dependiendo de la concentración del sobrenadante del cultivo). Como antígeno, se utilizó MAG-Fc de rata comercialmente disponible (R&D Systems; 538-MG). Debido a la fusión de este antígeno con Fc humano, anticuerpos quiméricos unidos no se podrían detectar usando anticuerpos secundarios generales de IgG anti – humanos. En cambio, se utilizó anticuerpo específico de cadena ligera kappa anti- humano. La figura 6 muestra que todos los 9 anticuerpos humanizados examinados en esta memoria descriptiva se unieron a MAG de rata con curvas de unión similares hasta ~ 4 ng/ml. El anticuerpo quimérico utilizado como referencia mostraba características de unión que caían dentro del grupo de anticuerpos humanizados examinados aquí. Aunque no es absoluto, esto puede sugerir que las afinidades de los anticuerpos humanizados examinados en esta memoria descriptiva se ubican muy cerca en el rango de afinidad del anticuerpo quimérico no humanizado usado como una referencia aquí.

Procedimiento

30 Placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp se recubrieron durante una noche a 4°C con proteína de fusión MAG - Fc de rata (1 µg/ml; R&D Systems; N° de cat.: 538-MG) en PBS. Se lavaron las placas dos veces con PBS que contenía Tween 20 (al 0,1% v/v; PBST) y se bloquearon con PBS que contenía BSA (al 1% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Cantidades variables de sobrenadantes de cultivo se diluyeron en serie en tampón de bloqueo y se añadieron a los pocillos bloqueados comenzando a aproximadamente 500 o 250 ng/ml. Las concentraciones de anticuerpos de los sobrenadantes se basaban en ensayos independientes midiendo la cantidad de anticuerpo humanizado presente en cada sobrenadante de cultivo. También se incluyó como referencia el anticuerpo de ratón – humano quimérico (no humanizado). Se incubaron las muestras de anticuerpo 1 h a TA y después se lavaron las placas tres veces con PBST. Un anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera de cabra anti-humano; Sigma A-7164) se añadió y se diluyó 1/5000 en tampón de bloqueo y se incubó durante 1 h a TA. Se lavaron los pocillos tres veces como antes y se detectó la unión mediante la adición de sustrato. (Comprimidos de OPD disueltos según las instrucciones; Sigma P-9187). Se controló el desarrollo de color y se detuvo la reacción utilizando H₂SO₄ 3 M. El desarrollo de color se leyó a 490 nm.

2) ELISA de unión directa a proteína de fusión MAG – Fc de rata de dos combinaciones de cadena pesada – ligera de anticuerpos anti – MAG humanizados purificados

45 Dos anticuerpos humanizados que consistían en combinaciones BVh1/CVI1 y BVh3/CVI3 de la región variable de cadenas pesada y ligera (tabla figura 5) y una región constante mutada de IgG1 como se ejemplifica en la SEC ID N.º: 30 (que es IgG1 mutado BVh1/CVI1, los expertos en la técnica pueden fácilmente derivar la secuencia para el equivalente BVh3/CVI3) se produjeron mediante una versión en subida de la transfección transitoria descrita en el ejemplo 3 y se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A. El material del anticuerpo purificado se dializó contra PBS y se determinó la concentración mediante lectura a D.O. 280. Las concentraciones de anticuerpos se ajustaron hasta 5000 ng/ml y se usaron como diluciones en serie en un ELISA de unión a MAG – Fc de rata. La figura 7 muestra que el material de anticuerpo purificado se une a MAG – Fc de rata y que ambas combinaciones de

la región variable de cadenas pesadas y ligeras ensayadas aquí son extremadamente similares.

Procedimiento

5 Placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp se recubrieron durante una noche a 4°C con proteína de fusión MAG- Fc de rata (2,5 µg/ml; R&D Systems; N.º de cat.: 538-MG) en PBS. Se lavaron las placas dos veces con PBS que contenía Tween 20 (al 0,1% v/v; PBST) y se bloquearon con PBS que contenía BSA (al 1% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se ajustó el anticuerpo humanizado purificado hasta una concentración de partida de 5 µg/ml en tampón de bloqueo y después se diluyó en serie. Se incubaron las muestras de anticuerpo 1 h a TA y se lavaron las placas tres veces con PBST. Un anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera de cabra anti-humano; Sigma A-7164) se añadió, se diluyó 1/5000 en tampón de bloqueo y se incubó durante 1 h a TA. Se lavaron los pocillos tres veces como antes y se detectó la unión mediante la adición de sustrato (comprimidos de OPD disueltos según las instrucciones; Sigma P-9187). Se controló el desarrollo de color y se detuvo la reacción utilizando H₂SO₄ 3 M. El desarrollo de color se leyó a 490 nm.

Resultados

15 Ambos anticuerpos purificados humanizados que llevan ninguna o varias mutaciones de estructura muestran unión extremadamente similar a MAG de rata. Los resultados se ven en la figura 7.

3) Unión a MAG humano expresado en células CHO de cantidades normalizadas de sobrenadante de cultivo para dos combinaciones de cadenas pesadas y ligeras humanizadas

20 Las mismas combinaciones de cadenas pesadas y ligeras variables humanizadas descritas en el ejemplo 5 2) se ensayaron como sobrenadantes de cultivos aclarados contra MAG humano expresado en la superficie de las células CHO. La cantidad de sobrenadante de cultivo utilizada para cada anticuerpo se normalizó en base a concentraciones de anticuerpo determinadas por ELISA. Para esto, placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) se recubrieron durante una noche a 4°C con cadena de IgG (gamma) de cabra anti-humano (sigma I – 3382; en tampón de bicarbonato pH 9,6; (2 µg/ml) El día siguiente se lavaron las placas dos veces con tampón de lavado (PBST) y se bloquearon mediante la adición de al menos 75 µl de tampón de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1% p/v) durante 1 h a TA. La solución de la muestra de anticuerpos se diluyó en serie en tampón de bloqueo (dilución de partida pura o de 1/2) por duplicado. El anticuerpo estándar era un anticuerpo IgG1 humanizado purificado de una especificidad no relacionada y concentración conocida. La dilución estándar también se diluyó en serie a través de placa comenzando a 500 ng/ml. Se incubaron todas las soluciones de anticuerpo 1 h a TA. Se lavaron las placas tres veces como antes y después se incubaron con conjugado de peroxidasa específico (libre y unido) de cadena ligera (kappa) cabra anti-humano; (Sigma A-7164) a 1/5000 en tampón de bloqueo durante 1 h a TA. Se lavaron las placas tres veces como antes y se incubaron con solución de sustrato (Comprimidos de OPD; Sigma P-9187 hasta desarrollo de un color fuerte). El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 25 µl de H₂SO₄ 3 M y se leyó la placa a 490 nm.

35 La figura 8 muestra que ambos anticuerpos ensayados aquí reconocen MAG humano y son muy similares en sus características de unión. CHO/- son controles negativos de células CHO sin MAG expresado.

Procedimiento para ELISA a base de células Eu

Se llenaron placas de 96 pocillos (Costar 3595) con 100 µl de suspensión celular/pocillo (véase la tabla más adelante para el número de células recomendado realizando el ensayo los días 1, 2, 3 o 4).

Día	Número de células/ml
1	3 x 10 ⁵
2	1 x 10 ⁵
3	5 x 10 ⁴
4	1 x 10 ⁴

40 Se retiró el medio de cultivo y se bloquearon las placas con DMEM/F12 (Sigma D6421) que contenía FCS (al 10%), BSA (al 1%), NaN₃ (al 1%; tampón de bloqueo) durante 1 hora a TA. Después se retiró la solución de bloqueo y se añadió la muestra (en tampón de bloqueo 50 µl/pocillo). Se incubaron las muestras a 4°C durante 1 h. Después las placas se lavaron 3 veces con PBS usando un lavador de placas Skatron. Después de lavar, las células se fijaron con paraformaldehído al 0,5% (diluido en PBS) durante 20 minutos a 4°C y se volvió a lavar como antes. Se añadieron 50µl/pocillo de anticuerpo secundario conjugado a Europio diluido en tampón Europio (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,5%, 0,1g/l de Tween 20, 7,86 mg/l de DTPA a pH 7,3) y se incubaron durante 1 h a 4°C. Se lavaron las placas como antes y se añadieron 200 µl de solución potenciadora Delphia/pocillo. Se incubó la solución a TA durante 5 – 10 minutos. Los pocillos se volvieron rojos en 24 horas sobre un Víctor.

4) Elisa de competición para unión a proteína de fusión MAG – Fc de rata de dos anticuerpos humanizados purificados y el anticuerpo monoclonal de ratón no humanizado

50 Procedimiento

Placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp se recubrieron durante una noche a 4°C con proteína de fusión MAG - Fc de rata (2,5 µg/ml; R&D Systems; N.º de cat.: 538-MG) en PBS. Se lavaron las placas dos veces con PBS que contenía Tween 20 (al 0,1% v/v; PBST) y se bloquearon con PBS que contenía BSA (al 1% p/v) durante 1 hora a temperatura

ambiente (TA). El anticuerpo humanizado purificado se ajustó hasta una concentración de 200 ng/ml y se mezcló en igual volumen con moléculas de competidor elaboradas en tampón de bloqueo variando de 6000 a 0 ng/ml. Los competidores eran bien anticuerpo monoclonal de ratón parental (anti-MAG) o bien un anticuerpo monoclonal de ratón no relacionado (INN1) a las mismas concentraciones (BVh1/CV11 solamente). Se incubaron las soluciones de anticuerpo/competidor 1 hora a TA y después las placas se lavaron 3 veces con PBST. Un anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera de cabra anti-humano; Sigma A-7164) se añadió, se diluyó 1/5000 en tampón de bloqueo y se incubó durante 1 h a TA. Se lavaron los pocillos tres veces como antes y se detectó la unión mediante la adición de sustrato. (Comprimidos de OPD disueltos según las instrucciones; Sigma P-9187). El desarrollo de color se midió a 490 nm.

5

10 **Resultados**

Ambas preparaciones de anticuerpos purificados compiten igualmente por el anticuerpo monoclonal original de ratón pero no por un anticuerpo monoclonal de ratón que tiene una especificidad no relacionada – véase la figura 9. Esto muestra que el anticuerpo monoclonal de ratón original y los anticuerpos humanizados ensayados en esta memoria descriptiva reconocen probablemente el mismo epítipo y posiblemente tienen afinidades muy similares a MAG de rata.

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-MAG humanizado que une y neutraliza MAG que comprende,
un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N.º: 13, SEC ID N.º: 14 y SEC ID N.º: 15 y un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N.º: 16, SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y SEC ID N.º: 19.
2. Un anticuerpo anti-MAG humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana y una parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana.
3. Un anticuerpo anti-MAG humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio variable de la cadena pesada es SEC ID N.º: 13.
4. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio variable de la cadena pesada es SEC ID N.º: 14.
5. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio variable de la cadena pesada es SEC ID N.º: 15.
6. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el dominio variable de la cadena ligera es SEC ID N.º: 16.
7. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el dominio variable de la cadena ligera es SEC ID N.º: 17.
8. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el dominio variable de la cadena ligera es SEC ID N.º: 18.
9. Un anti-MAG humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el dominio variable de la cadena ligera es SEC ID N.º: 19.
10. Un anticuerpo anti-MAG humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada es SEC ID N.º: 13 y el dominio variable de la cadena ligera es SEC ID N.º: 16.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG humanizado según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un anticuerpo anti-MAG humanizado según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el tratamiento o profilaxis de apoplejía.
13. Un anticuerpo anti-MAG humanizado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el anticuerpo se administra intravenosamente.
14. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Una célula huésped cotransfectada con los vectores primero y segundo que codifican las cadenas pesada y ligera respectivamente de un anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
16. Una célula huésped transfectada con un vector que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
17. Un procedimiento de producción de un anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped según se define en la reivindicación 15 o en la reivindicación 16 y de recuperar el anticuerpo así producido.

Figura 1

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIQLVQSGPELKKPGETNKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKW
MGWINTYTGEPYADDFTRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCARNPINYYGINYEGYVM
DYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAG
APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 2

MGWSCIIILFLVATATGVHSNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPG
QSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIINVHTEDLAVYYCHQYLSSLTFTGTGKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 3

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIQLVQSGPELKKPGETNKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKW
MGWINTYTGEPYADDFTRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCARNPINYYGINYEGYVM
DYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Figura 4

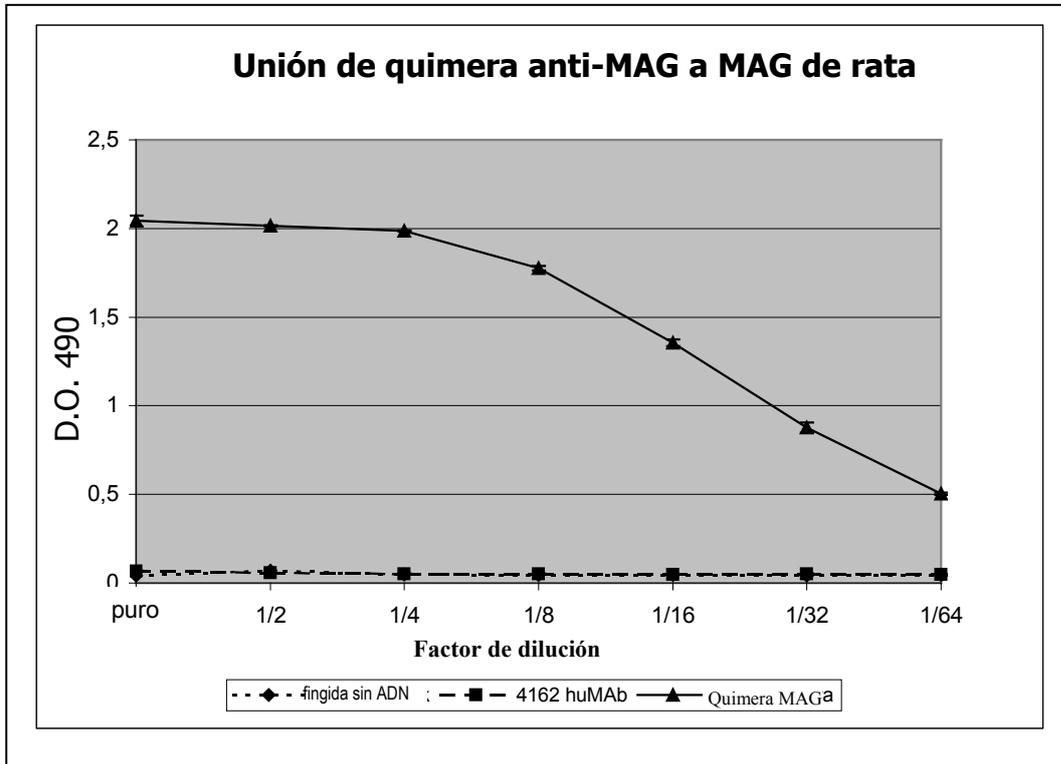


Figura 5

SEC ID N.º: 30

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYT
GEPTYADDFTRGFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTTLTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

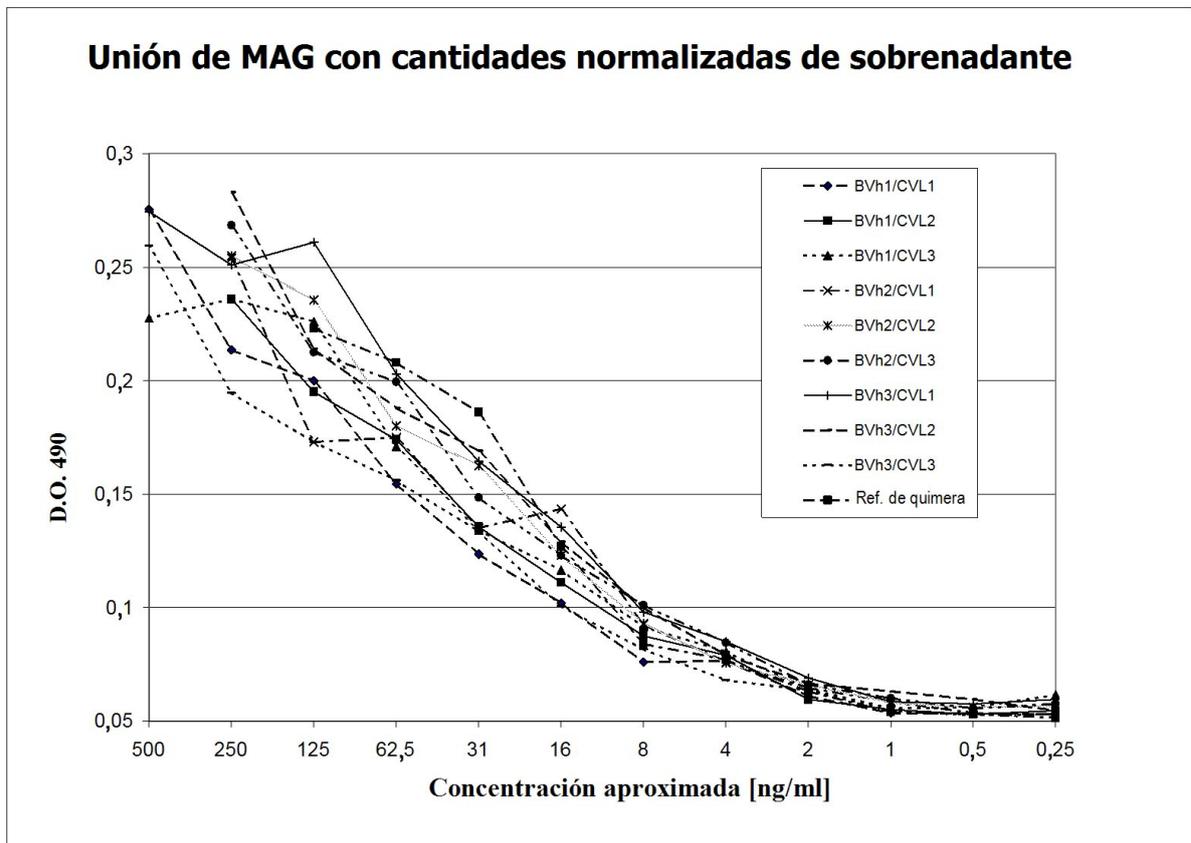
SEC ID N.º: 31

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCHQYLSSLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

SEC ID N.º: 32

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYT
GEPTYADDFTRGFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTTLTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 6



Material de anticuerpo purificado a concentraciones determinadas por D.O. 280

Figura 7

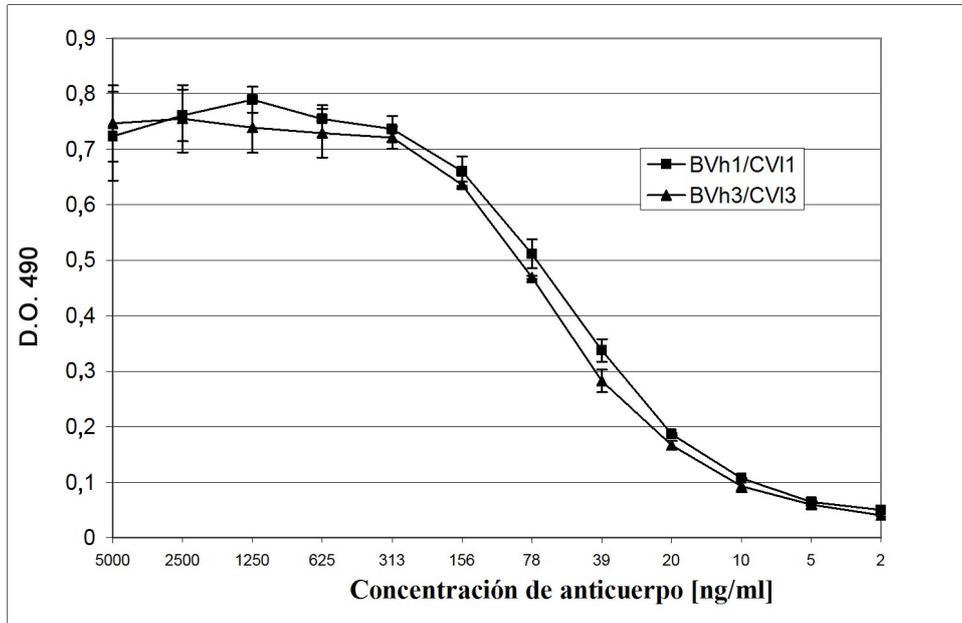


Figura 8

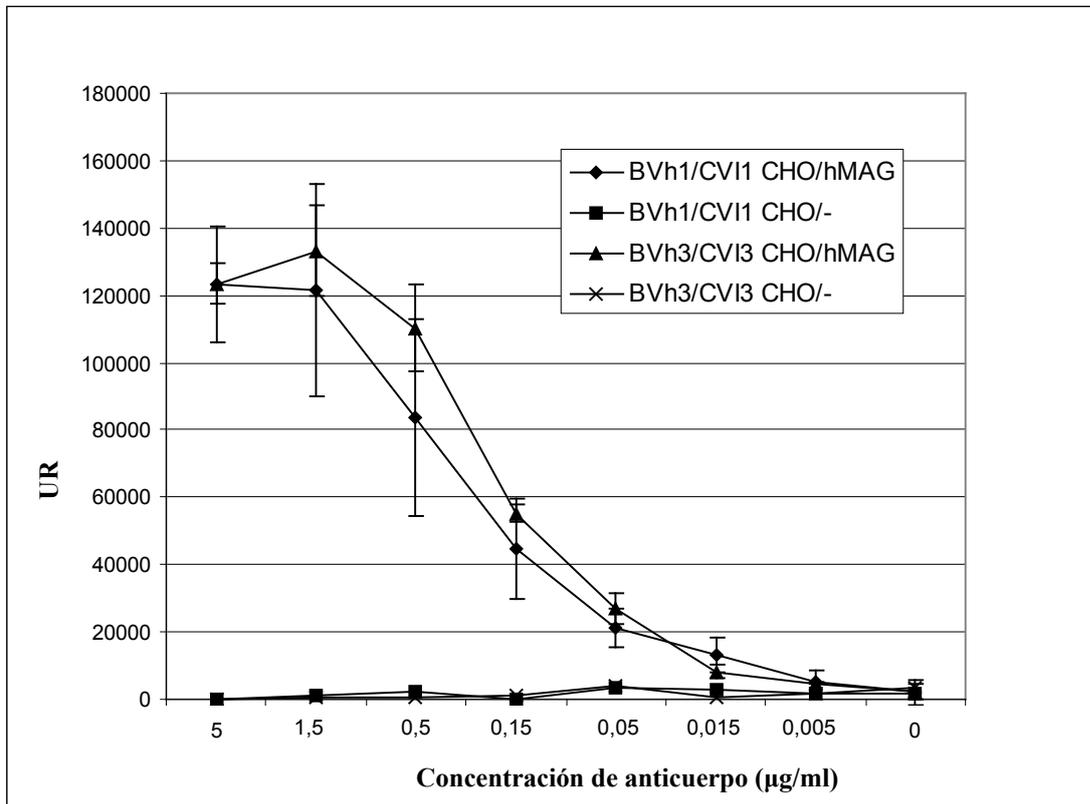


Figura 9

ELISA de competición para unión a proteína de fusión MAG-Fc de dos anticuerpos humanizados purificados y el anticuerpo monoclonal de ratón no humanizado

