

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 993**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2004 E 04752450 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1648427**

54 Título: **Dosis bajas de anticuerpos IgM para tratamiento de trastornos desmielinizantes**

30 Prioridad:

16.05.2003 US 471235 P

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

28.03.2014

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US y
ACORDA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRUSKIN, ELLIOT A.;
CHOJNICKI, ERIC;
WARRINGTON, ARTHUR E.;
BIEBER, ALLAN J. y
RODRIGUEZ, MOSES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 451 993 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

Dosis bajas de anticuerpos IgM para tratamiento de trastornos desmielinizantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de neurobiología, y más particularmente a la identificación de anticuerpos producidos recombinantemente que juegan un papel en la función y terapia del sistema nervioso central. La invención también se refiere a materiales y métodos terapéuticos, que a modo de ejemplo incluyen composiciones farmacéuticas, métodos de tratamiento de enfermedades asociadas con trastorno neurológico, métodos de regeneración y restauración de función neural, ensayos de cribado y vacunas.

10 Antecedentes de la invención

15 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) crónica, inflamatoria y frecuentemente progresiva caracterizada patológicamente por la desmielinización primaria, normalmente sin una lesión axonal inicial. Se desconoce la etiología y patogénesis de ES. Varias características inmunológicas de ES, y su moderada asociación con ciertos alelos complejos principales de histocompatibilidad, han provocado la especulación de que EA sea una enfermedad inmunmediada.

20 Una hipótesis autoinmune se apoya en el modelo de encefalomiелitis (EAE) (alérgica) autoinmune experimental, donde la inyección de ciertos componente de mielina en animales genéticamente susceptibles lleva a la desmielinización del SNC medida por célula T. Sin embargo, no se han identificado definitivamente autoantígenos específicos y células T reactivas con mielina patogénica en el SNC de pacientes de EM, ni en EA asociada con otras enfermedades autoinmunes. Una hipótesis alternativa, en base a los datos epidemiológicos, es que un factor ambiental, quizás un virus no identificado, precipita una respuesta inflamatoria en el SNC, lo que lleva a la destrucción de mielina directa o indirecta ("presencial"), potencialmente con un componente autoinmune inducido. Esta hipótesis se apoya en la evidencia de que varias infecciones virales que ocurren de manera natural, tanto en humanos como en animales, pueden causar desmielinización. Un modelo viral experimental comúnmente utilizado es inducido por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (VEMT) (Dal Canto, M. C., y Lipton, H. L., Am. J. Path., 88:497-500 (1977)).

30 La eficacia limitada de las terapias actuales para EM y otras enfermedades desmielinizantes, ha estimulado el interés en terapias nuevas para mejorar estas enfermedades. Sin embargo, debido a la aparente etiopatogénesis compleja de estas enfermedades, que potencialmente incluyen factores ambientales y autoinmunes, existe la necesidad de un tratamiento efectivo de estos trastornos desmielinizantes.

35 rHlgM22 es un anticuerpo IgM humano recombinante que se enlaza con oligodendrocitos maduros y mielina de roedores y humanos, y promueve la síntesis de nueva mielina en in vivo de desmielinización. El uso de sHlgM22 (LYM 22) para estimular la desmielinización del sistema nervioso central en un mamífero que necesite tal tratamiento se describe en WO 01/85797, que desvela la administración de anticuerpo monoclonal en una dosis de entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg.

40 El objetivo de anticuerpos IgM \times hacia los oligodendrocitos para promover remielinización del SNC se analiza en Asakura, K. et al., (J. Neuroscience, Oct 1998, 18(19):7700-7708). Asakura, K. et al., describe cómo se les da a ratones infectados con un modelo viral de esclerosis múltiple inyecciones intraperitoneales de mAb dos veces a la semana durante 5 semanas (50 μ g/inyección). La dosis total de cada Ab fuer 0,5 mg.

45 La dosis estándar de mAbs que promueven remielinización en estudios previos ha sido 25 mg/kg administrada IP. Esta dosis, si se extrapola a humanos, sería poco práctica.

50 Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar un régimen de tratamiento práctico, seguro y eficaz para trastornos del SNC, particularmente aquellos que incluyen desmielinización y/o remielinización, y la presente invención se dirige hacia el cumplimiento de esa necesidad.

55 La citación de cualquier referencia en el presente documento no debería interpretarse como una admisión de que tal referencia está disponible como "Técnica Anterior" para la solicitud presente.

Resumen de la invención

60 El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no esté clasificada dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente como informativo.

65 De acuerdo con la presente invención, se han clonado y aislado anticuerpos humanos para demostrar actividad en la promoción, estimulación, regeneración y/o remielinización de neuronas en el sistema nervioso central, y/o en el bloqueo o reducción de desmielinización en el sistema nervioso central. Específicamente, la presente divulgación se refiere a métodos para estimular la remielinización de axones del sistema nervioso central (SNC)

usando autoanticuerpos recombinante, y particularmente autoanticuerpos humanos recombinantes, incluyendo anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de los mismos, o mezclas y/o fragmentos activos de los mismos, caracterizados por su habilidad para enlazarse a estructuras en el sistema nervioso central, particularmente incluyendo oligodendrocitos.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo IgM monoclonal humano, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada como se expone en la FIGURA 5 y SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera como se expone en la FIGURA 6 y SEQ ID NO: 9, y un transportador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de desmielinización en un humano caracterizado en que el tratamiento o prevención comprende la administración del anticuerpo en una dosis diaria en el rango de 1,25 µg/kg a 2,5 µg/kg de peso corporal.

10 La invención también proporciona un anticuerpo IgM monoclonal humano, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada como se expone en la FIGURA 5 y SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera como se expone en la FIGURA 6 y SEQ ID NO: 9 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de desmielinización en un humano caracterizado en que el tratamiento o prevención comprende la administración del anticuerpo en una dosis diaria en el rango de 1,25 µg/kg a 2,5 µg/kg de peso corporal.

15 En una primera realización de la invención, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención es el anticuerpo humano rHIgM22, y la composición incluye tal anticuerpo en una cantidad como la detallada en la reivindicación 1 efectiva para promover la remielinización en el sistema nervioso central. En un aspecto de la divulgación el anticuerpo y la composición correspondiente se preparan para entregar dosis que oscilan entre aproximadamente 500 ng y aproximadamente 600 µg, calculados sobre una base de kg de peso corporal. En un aspecto particular de la divulgación, las dosis pueden estar en el orden de 500 ng, o pueden estar en el orden de 600 µg.

20 En una realización particular, el tratamiento o prevención comprende la administración de anticuerpo rHIgM22 en una composición farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el tratamiento o prevención comprende la administración del anticuerpo rHIgM22 en combinación con metilprednisolona. La metilprednisolona puede administrarse en dosis que oscilan entre aproximadamente 1 y 2 mg una vez o dos veces a la semana.

25 En otra realización, el tratamiento o prevención comprende la administración del anticuerpo rHIgM22 con metilprednisolona simultáneamente o puede ser secuencialmente.

30 La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo rHIgM22 y un transportador farmacéuticamente aceptable como se detalla en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de desmielinización en un humano como se detalla en la reivindicación 1. En una realización, la composición comprende el anticuerpo rHIgM22 solo. En otra realización, la composición comprende el anticuerpo rHIgM22 en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de metilprednisolona. En otra realización más, la composición del anticuerpo rHIgM22 puede formularse como una composición, y la metilprednisolona puede formularse como una composición separada, y el tratamiento o prevención comprende la entrega de cada una a un sujeto que necesite tal terapia secuencialmente o simultáneamente. En otra realización más, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo rHIgM22 es una cantidad que promueve remielinización de neuronas. En otra realización, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo rHIgM22 es una cantidad que previene la desmielinización. En otra realización más, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo rHIgM22 es una cantidad que disminuye la desmielinización mientras también promueve la remielinización. Cuando se usa en combinación con metilprednisolona, el anticuerpo rHIgM22 puede ser más efectivo en la prevención de desmielinización, promover remielinización o una combinación de las mismas.

35 Otro aspecto de la divulgación proporciona fragmentos y monómeros derivados de o relacionados con anticuerpos humanos recombinantes de la presente invención. De este modo, la divulgación se extiende particularmente a fragmentos, o monómeros derivados de o en base de sHIgM22 (LYM 22). Tales fragmentos y/o monómeros poseen la misma actividad que la molécula de anticuerpo matriz y pueden demostrar la capacidad para remielinizar neuronas o prevenir desmielinización de neuronas.

40 Otro aspecto de la divulgación proporciona un ensayo para cribar otros anticuerpos y socios relacionados de enlace, incluyendo haptenos y análogos peptídicos, que pueden mostrar una actividad terapéutica similar. Tales actividades incluirían el tratamiento o prevención de lesiones o disfunciones neurológicas tales como esclerosis múltiples, ELA, apoplejía, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.

45 Otro aspecto de la invención proporciona la composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en métodos para tratar enfermedades desmielinizantes en mamíferos, tales como esclerosis múltiples en humanos, y

enfermedades virales del sistema nervioso central de humanos y animales domésticos, tales como encefalomiелitis post-infecciosa, o para inhibir profilácticamente la iniciación o progresión de desmielinización en estos estados de enfermedad, usando el anticuerpo monoclonal recombinante como se detalla en la reivindicación 1.

5 Esta divulgación se refiere además a métodos in vitro para producir y estimular la proliferación de célula gliales, tales como oligodendrocitos, y el uso de estas células gliales para tratar enfermedades desmielinizantes. Por consiguiente, en un aspecto, la condición o trastorno neurológico desmielinizante para el que tal terapia de anticuerpo sería efectiva es esclerosis múltiple. En otro aspecto, la condición o trastorno neurológico desmielinizante para el que tal terapia de anticuerpo sería efectiva es lesión aguda o grave de la médula espinal.
10 También se contemplan otras condiciones o enfermedades neurológicas en las que la desmielinización de nervios o fibras nerviosas es prominente.

La presente divulgación también se extiende a la clonación, aislamiento y uso de autoanticuerpos humanos recombinantes que ayudan en la remielinización de neuronas o prevenir la desmielinización de neuronas, cuyos autoanticuerpos humanos se ejemplifican por rHIgM22. Los siguientes términos se usan intercambiamente a lo largo de esta solicitud: RsHIgM22, SHIgM22, rHIgM22 y LYM 22. Las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo recombinante rHIgM22 se exponen en las FIGURAS 5 y 6 y por consiguiente, la divulgación se extiende a anticuerpos y proteínas de anticuerpo correspondientes, y moléculas pequeñas tales como haptenos, que tienen o corresponden al menos en parte a las secuencias expuestas en las Figuras señaladas. Estas secuencias del anticuerpo pueden usarse en parte para clonar la forma recombinante humana del anticuerpo, o pueden usarse como sondas para fines investigativos o de diagnóstico. La divulgación se extiende además en que los anticuerpos recombinantes recién identificados pueden emplearse para una variedad de fines tales como la promoción de remielinización, regeneración de células nerviosas dañadas, protección neuronal, proliferación neuronal y similares.

25 La divulgación también se dirige en términos generales a péptidos que se enlazan con los autoanticuerpos aquí descritos, por lo que estos péptidos en virtud de su secuencia, estructura tridimensional o cambios conformacionales que surgen del enlace de anticuerpo, pueden usarse por sí mismos como vacunas peptídicas. En un aspecto adicional de la divulgación, estos péptidos pueden tener propiedades neuromoduladoras y/o inmunomoduladoras y pueden proporcionar un método para inducir una respuesta proliferativa de célula neural y/o papel neuroprotector, neurogenerativo y/o remielinizante en mamíferos que necesitan tal terapia.

30 De la misma manera, la divulgación incluye haptenos que se enlazan con péptidos y/u otros sustratos relevantes y que pueden poseer inmunogenicidad, para que también puedan funcionar como componentes activos en formulaciones terapéuticas, también incluyendo vacunas. En un aspecto adicional, pueden combinarse uno o más haptenos con otros de los péptidos de la presente divulgación, en una formulación de vacuna.

35 En un aspecto más de la divulgación estos péptidos pueden formularse como composiciones farmacéuticas con estabilizadores para prevenir la degradación proteolítica, extendiendo así su vida media para administrarse oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intratecalmente o como una preparación de liposoma a mamíferos que necesiten tal terapia.

40 En un aspecto adicional, la divulgación se extiende a un grupo de moléculas que se referirán en el presente documento como agentes neuromoduladores, y que no notables en su actividad terapéutica en el SNC. Por consiguiente, la invención se refiere a agentes neuromoduladores con particular eficacia en el SNC, cuyos agentes comprenden un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo del subtipo IgM, un análogo peptídico, un hapteno, fragmentos activos de los mismos, monómeros de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos relacionados de diferentes subtipos, incluyendo aquellos que han sufrido una conmutación de clase (naturalmente o generados a través de medios recombinantes o sintéticos), también se contemplan, donde los anticuerpos con conmutación de clase tienen característica como agentes neuromoduladores útiles en los métodos de la presente divulgación. Los agentes neuromoduladores tienen una o más de las siguientes características: inducen remielinización y/o proliferación celular de células gliales; y/o provocan señalización Ca^{++} con oligodendrocitos; y/o bloquean muerte celular, por ejemplo, muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno.

45 Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden usarse junto con otros anticuerpos que se enlazan con tejido neural, tales como anticuerpos policlonales que también pueden inducir remielinización, en particular otros anticuerpos policlonales IgM, particularmente inmunoglobulina policlonal IgM y preparación de la misma, más particularmente inmunoglobulina policlonal agrupada IgM e inmunoglobulina humana policlonal agrupada IgM. Preferentemente, el otro anticuerpo es un anticuerpo humano producido recombinantemente o anticuerpo quimérico producido recombinantemente capaz de remielinización. El anticuerpo recombinante para su uso en la invención es rHIgM22 (LYM22). También se desvelan monómeros del mismo, fragmentos activos del mismo y anticuerpos naturales o sintéticos que tienen las características de rHIgM22. La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido correspondiente al menos en parte a una secuencia seleccionada de las FIGURAS 5 y 6, y fragmentos activos de la misma.
60
65

La presente divulgación también se refiere a una molécula recombinante de ADN o gen clonado, o una variante degenerada de la misma, que codifica una clase de moléculas que también se referirán en el presente documento como agentes neuromoduladores, y que incluyen y pueden seleccionarse de los anticuerpos de la divulgación, y particularmente anticuerpos que tienen secuencias correspondientes al menos en parte a las secuencias presentadas en las FIGURAS 5 y 6; péptidos que pueden corresponder al menos en parte a los anticuerpos de la presente divulgación que también se referirán en el presente documento como péptidos de anticuerpos, y por ejemplo, péptidos que tienen una o más secuencias correspondiente al menos en parte a las FIGURAS 5 y 6; y moléculas pequeñas tales como haptenos; incluyendo moléculas recombinantes de ADN o genes clonados que tienen las mismas secuencias o secuencias complementarias.

La presente divulgación también incluye proteínas derivadas de o correspondientes a dichos anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, que tienen las actividades aquí señaladas, y que muestran las secuencias de aminoácido expuestas y descritas anteriormente y seleccionadas al menos en parte del grupo consistente de las FIGURAS 5 y 6.

La presente divulgación se extiende de la misma manera a haptenos que demuestran las mismas actividades que las proteínas o péptidos de anticuerpos, y que pueden administrarse para fines terapéuticos de la misma manera, o mediante formulación en una vacuna. En un aspecto puede prepararse una vacuna que incluye péptidos y haptenos.

En un aspecto adicional de la divulgación la secuencia completa de ADN de la molécula recombinante de ADN o gen clonado así determinado puede unirse operativamente a una secuencia de control de expresión que puede introducirse en un huésped apropiado. La divulgación se extiende por consiguiente a huéspedes unicelulares transformados con el gen clonado o molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica los presentes péptidos de anticuerpo.

En un aspecto particular la secuencia de ADN de región variable de un anticuerpo de la presente divulgación puede utilizarse en la generación de anticuerpo(s) sintético(s). En particular, la secuencia de región variable puede combinarse con su secuencia de región constante natural o genéticamente proporcionada para proporcionar un anticuerpo sintético. La presente divulgación proporciona vectores para generar anticuerpos sintéticos derivados de y que comprenden secuencias de ADN, particularmente secuencias de región variable, de los anticuerpos de la presente divulgación.

De acuerdo con otras características preferentes de ciertos aspectos preferentes de la presente divulgación, se proporciona un sistema de expresión recombinante parar producir péptidos de anticuerpo animales biológicamente activos o particularmente humanos.

La presente divulgación incluye varios medios para la preparación de clones de los anticuerpos, péptidos, haptenos correspondientes y otros análogos de molécula pequeña de los mismos, incluyendo como aquí se ilustran técnicas recombinantes conocidas, y la divulgación pretende por consiguiente cubrir tales preparaciones sintéticas dentro del alcance. El aislamiento del cADN y las secuencias de aminoácido aquí desveladas facilita la reproducción de los anticuerpos presentes o sus análogos mediante tales técnicas, y por consiguiente, la divulgación se extiende a vectores de expresión preparados a partir de las secuencias desveladas de ADN para la expresión en sistemas huéspedes mediante técnicas de ADN recombinante, y a los huéspedes transformados resultantes.

La divulgación incluye un sistema de ensayo para cribar los fármacos potenciales efectivos para modular la actividad neurológica de células neurales de mamíferos dianas, por ejemplo, potenciando la actividad de los presentes autoanticuerpos o sus análogos. En un caso, el fármaco del test podría administrarse a una muestra celular con el ligando que suprime o inhibe la actividad de los autoanticuerpos, o un extracto que contiene los anticuerpos suprimidos, para determinar su efecto después de la actividad de enlace de los autoanticuerpos a una muestra química (incluyendo ADN), o a un fármaco de test, mediante comparación con un control.

La presente divulgación incluye un sistema de ensayo que puede prepararse en forma de un kit de test para el análisis cuantitativos de la presencia de los agentes neuromoduladores, o para identificar fármacos u otros agentes que imitan o bloquean su actividad. El sistema o kit de de test puede comprender un componente etiquetado preparado mediante una de las técnicas radioactivas y/o enzimáticas aquí analizadas, acoplado una etiqueta a los agentes neuromoduladores, sus agonistas y/o antagonistas, y uno o más reagentes inmunoquímicos adicionales, donde al menos uno de ellos es un ligando libre o inmovilizado, capaz de enlazarse con el componente etiquetado, su pareja de enlace, uno de los componentes que se determinarán o su(s) pareja(s) de enlace.

En un aspecto particular y adicional, la presente divulgación se extiende al uso y aplicación de los anticuerpos de la presente divulgación, en particular autoanticuerpos, que incluyen anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de los mismos, o mezclas y/o fragmentos activos de los mismos, caracterizados por su habilidad para enlazarse a estructura y célula en el sistema nervioso central, incluyendo particularmente oligodendrocitos, en aplicaciones de formación de imágenes y diagnóstico *in vivo*. De este modo, los anticuerpos, en virtud de su habilidad para enlazarse a estructura y célula en el sistema nervioso central, incluyendo particularmente

oligodendrocitos, pueden utilizarse por medio de etiquetas inmunofluorescentes, radiactivas y otras etiquetas diagnósticamente adecuadas como agentes formadores de imágenes o moléculas formadoras de imágenes para la caracterización del sistema nervioso, incluyendo el sistema nervioso central y el diagnóstico, monitorización y evaluación de enfermedad nerviosa, que incluyen particularmente esclerosis múltiple. Los anticuerpos pueden además utilizarse como agentes formadores de imágenes o moléculas formadoras de imágenes en el diagnóstico, monitorización y evaluación de apoplejía, lesión de la médula espinal y varias demencias que incluyen enfermedad de Alzheimer.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a ciertos métodos terapéuticos que se basarían en la actividad de agentes neuromoduladores, sus subunidades, o fragmentos activos de los mismos, equivalentes peptídicos de los mismos, análogos de los mismos o en agentes u otros fármacos determinados por poseer la misma actividad. Un primer método terapéutico está asociado con la prevención de las manifestaciones o condiciones que se relacionan causalmente con o que resultan de la actividad de enlace de los anticuerpos o sus subunidades, y que comprende la administración de un agente capaz de estimular la producción y/o actividad de los agentes neuromoduladores, los correspondientes autoanticuerpos, péptidos de anticuerpo, fragmentos activos o subunidades de los mismos, bien individualmente o mezclados entre sí en una cantidad efectiva para prevenir o tratar el desarrollo de aquellas condiciones en el huésped. Por ejemplo, los fármacos u otras parejas de enlace a los anticuerpos o sus fragmentos, o similares, pueden administrarse para potenciar actividad neuroregeneradora y/o neuroprotectora, o para estimular remielinización como en el tratamiento de esclerosis múltiple.

Más específicamente, el método terapéuticos aquí referido generalmente podría incluir el método para el tratamiento de varias patologías u otras disfunciones o desequilibrios celulares mediante la administración de composiciones farmacéuticas que pueden comprender inhibidores o potenciadores efectivos de la activación de los agentes neuromodulares, u otros fármacos igualmente efectivos desarrollados por ejemplos por un ensayo de cribado de fármacos preparado y usado de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación analizado anteriormente. Por ejemplo, los fármacos u otras parejas de enlace con los agentes neuromoduladores o proteínas similares, que tienen secuencias correspondientes al menos en parte a las secuencias como las representadas en las FIGURAS 5 y 6, pueden administrarse para inhibir o potenciar neuroregeneración, neuroprotección, o remielinización como en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiples. En particular, las proteínas de sHlgM22 (LYM22), cuya secuencia se presenta en las FIGURAS 5 y 6 puede usarse de acuerdo con la invención como se detalla en las reivindicaciones 1 y 10 en combinación con sus agonistas, antagonistas, monómeros o fragmentos activos de los mismos, incluyendo mezclas y combinaciones de los mismos y, podrían prepararse en formulaciones farmacéuticas que incluyen vacunas, para su administración en casos donde la terapia neuroregeneradora y/o neuroprotectora o remielinización es apropiada, tal como para tratar enfermedad de Alzheimer, ELA, enfermedad de Parkinson o lesión de la médula espinal. La presente invención incluye una composición farmacéutica como la definida en la reivindicación 1 que comprende combinaciones de los anticuerpos aquí proporcionados, donde los anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos, pueden prepararse en composiciones farmacéuticas o terapéuticas, para su uso como el descrito en la reivindicación 1. Las combinaciones o mezclas de varios anticuerpos humanos, anticuerpos de ratón, o monómeros, fragmentos, anticuerpos recombinantes o sintéticos derivados de los mismos o basados en los mismos también se proporcionan y pueden incluirse en composiciones de la presente invención. Los anticuerpos humanos (que se extienden a monómeros, fragmentos, anticuerpos recombinantes o sintéticos derivados de los mismos) que pueden incluirse en composiciones de la invención se seleccionan particularmente del grupo de sHlgM46, MSI19E10, CB2bG8, AKJR4, CB2IE12, CB2IE7, MSI1985 y MSI10E10. Los anticuerpos de ratón (que se extienden a monómeros, fragmentos, anticuerpos recombinantes o sintéticos y anticuerpos humanizados derivados de los mismos) se seleccionan particularmente del grupo de SCH 94.03, SCH79.08, O1, O4, O9, A2B5 y HNK-1. Además, la invención proporciona más combinaciones de anticuerpo(s) con compuestos, fármacos o agentes terapéuticos útiles en tal terapia neuroregeneradora y/o neuroprotectora o remielinización. Por ejemplo, la formulación o composición de anticuerpo de la presente invención puede combinarse con compuestos terapéuticos para el tratamiento de esclerosis múltiples, incluyendo aunque sin limitar a formulaciones de interferón beta (Betaseron, etc.) y copolímero 1 (Copaxone). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden combinarse con otros agentes que pueden actuar para inhibir inflamación en el sitio de la lesión. Un agente así puede ser metilprednisolona. El uso de metilprednisolona para tratar esclerosis múltiples se describe en Van Oosten, B. W. et al. (Drugs, 1998, 56(4): 555-569).

Por consiguiente, es un principal objeto de la presente divulgación proporcionar agentes neuromoduladores, que incluyen los autoanticuerpos humanos y correspondientes péptidos de anticuerpos, haptenos, análogos y fragmentos activos de los mismos en forma purificado que muestren ciertas características y actividades asociadas con la promoción de actividad neuroregeneradora y/o neuroprotectora.

Es un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un método para detectar la presencia, cantidad y actividad de los autoanticuerpos en mamíferos en los que se sospecha que estados patológicos invasivos, espontáneos o idiopáticos están presentes.

Es un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un método y sistema de ensayo asociado para cribar sustancias tales como fármacos, agentes y similares, potencialmente efectivos en imitar la actividad o

combatir cualquier efecto adverso de los autoanticuerpos y/o sus fragmentos, subunidades o similares, en mamíferos.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIGURA 1 es un gráfico de resultados de un estudio comparativo por rango de dosis, con concentraciones variadas de rHlgM22, placebo, metilprednisolona sola y en combinación con rHlgM22.

10 La FIGURA 2 es un gráfico de los resultados medios de los grupos de sujetos del test en el estudio por rango de dosis.

La FIGURA 3 es un gráfico que demuestra que rHlgM22 combinado con metilprednisolona promueve la remielinización y reduce la carga de lesión.

15 La FIGURA 4 es un gráfico de resultados de un estudio comparativo por rango de dosis con concentraciones variadas de rHlgM22.

20 La FIGURA 5 presenta las secuencias de región variable de cadena pesada de sHlgM22. La secuencia está alineada de acuerdo con el sistema de numeración de secuencias humanas V_H en la publicación: Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Vol. I, Quinta Edición (1991), Kabat E. A., Wu, T. T., Perry, H. M. Gottesman, K. S. y Foeller, C., Publicación NIH. El sHlgM22 V_H es un miembro del subgrupo III V_H. Los aminoácidos subrayados se han confirmado por la secuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácido corresponde a la secuencia de nucleótido sHlgM22. Las secuencias A y B de tipo SHlgM22 V_H están únicamente representadas con nucleótidos que difieren de las secuencias de línea germinal IGHV3-30/3-30-05*01, IGHJ4*02 y IGHD2-21*02. Dos sustituciones de aminoácido en la secuencia de proteína de tipo B SHlgM22 V_H están impresas en negrita. Las secuencias de ambos A y B de tipo sHlgM22 V_H están coinciden mucho con la secuencia de línea germinal IGHV3-30/3-30-5*01 (96% homología). Las referencias para las secuencias de línea germinal: IMGT, la base de datos internacional de Inmunogenética [<http://imgt.cnusc.fr:8104>]. (Iniciador y coordinador: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia).

30 La FIGURA 6 presenta las secuencias de región variable de cadena ligera de sHlgM22. La secuencia está alineada de acuerdo con el sistema de numeración de secuencias humanas V_L en la publicación: Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Vol. I, Quinta Edición (1991), Kabat E. A., Wu, T. T., Perry, H. M. Gottesman, K. S. y Foeller, C., Publicación NIH. El sHlgM22 V_L es un miembro del subgrupo I lambda. Los aminoácidos subrayados se han confirmado por la secuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácido corresponde a la secuencia de nucleótido sHlgM22. Las secuencias I y II de tipo SHlgM22 V_L están únicamente representadas con nucleótidos que difieren de las secuencias de línea germinal IGLV1-51*01 e IGLJ3*01. Dos sustituciones de aminoácido en la secuencia de proteína de tipo II de sHlgM22 V_L están impresas en negrita. Las secuencias V_L de SHlgM22 V_H coinciden mucho con la secuencia de línea germinal IGLV-51*01 (97% homología). Las referencias para las secuencias de línea germinal: IMGT, la base de datos internacional de Inmunogenética [<http://imgt.cnusc.fr:8104>]. (Iniciador y coordinador: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia).

Descripción detallada de la invención

45 El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no esté clasificada dentro de las reivindicaciones únicamente se proporciona como informativa.

50 Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. De este modo, por ejemplo, las referencias a “el método” incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo aquí descrito y/o que serán aparentes para aquellos expertos en la técnica después de leer la divulgación y demás.

55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece comúnmente entendería. Aunque cualquier método y material equivalente a los aquí descritos pueden usarse en la práctica o pruebas de la invención, ahora se describen los métodos y materiales preferentes.

Definiciones

60 También como se usan aquí, los términos “rHlgM” y “rsHlgM”, “sHlgM22” y “LYM22” por pertenecer a los anticuerpos de la invención, deben considerarse aquí equivalentes.

“Sujeto” incluyen humanos. Los términos “humano”, “paciente” y “sujeto” aquí se usan intercambiamente.

65 “Cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La “cantidad

terapéuticamente efectiva" puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su severidad y la edad, peso, etc., del sujeto que se tratará.

5 "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno se refieren, en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (esto es, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización "tratar" o "tratamiento" se refieren a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refieren a retrasar la aparición de la enfermedad o trastorno.

15 Los términos "agente(s) neuromodulador(es)" como aquí se usan singularmente a lo largo de la presente solicitud, pretenden referirse a una amplia clase de materiales que funcionan para promover la proliferación, regeneración y remielinización de neuritas con particular beneficio y efecto en el SNC, y por lo tanto incluyen los anticuerpos del subtipo IgM, y particularmente anticuerpos humanos tales como aquellos referidos aquí específicamente como sHlgM22 (LYM 22), ebvHlgM MS119D10, sHlgM46 (LYM46), CB2bG8, AKJR4, CB2iE12, CB2iE7 y MS119E5, análogos peptídicos, haptenos, fragmentos activos de los mismos, monómeros de los mismos, agonistas, imitadores y similares. Agente(s) neuromodulador(es) también incluyen y abarcan combinaciones o mezclas de más de uno de los anticuerpos aquí proporcionados, incluyendo monómeros o fragmentos activos de los mismos.

20 También, los términos "agentes neuromoduladores", "autoanticuerpo", "péptidos de anticuerpo", "péptido", "hapteno" y cualquier variante no específicamente enumerada, pueden usarse aquí intercambiamente, hasta el punto de que todos pueden referirse e incluir material proteico incluyendo proteínas sencillas o múltiples, y se extienden a aquellas proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácido aquí descrita y presentada en la FIGURAS 5-6, y el perfil de actividades aquí expuestas y en la Reivindicaciones. Por consiguiente, las proteínas que muestran actividad sustancialmente equivalente o alterada se contemplan de la misma manera. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, pueden ser accidentales, tales como aquellas obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus llamadas subunidades. También, los términos "agentes neuromodulador", "autoanticuerpo", "péptido de anticuerpo", "péptido", "hapteno", cuando es apropiado, pretenden incluir sus proteínas de alcance específicamente aquí detalladas así como todos los análogos sustancialmente análogos y variaciones alélicas.

35 Los residuos de aminoácido aquí descritos son preferentes en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre y cuando el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada del enlace de inmunoglobulina. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en la terminal amino del polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en la terminal carboxi de un polipéptido. Al mantener la nomenclatura estándar de polipéptidos, J. Biol. Chem. 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

TABLA DE CORRESPONDENCIA

	SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
	1 Letra	3 Letras	
45	Y	Tir	tirosina
	G	Gly	glicina
50	F	Fen	fenilamina
	M	Met	Metionina
	A	Ala	Alanina
	S	Ser	Serina
55	I	Ile	Isoleucina
	L	Leu	Leucina
	T	Tre	Treonina
60	V	Val	Valina
	P	Pro	Prolina
	K	Lis	Lisina
65	H	His	Histidina

	Q	Gln	Glutamina
5	E	Gln	Ácido glutámico
	W	Trp	Triptófano
	R	Arg	Arginina
10	D	Asp	Ácido aspártico
	N	Asn	Aspargina
	C	Cis	Cisteína

15 Debería señalarse que todas las secuencias de residuo de aminoácido están aquí representadas por formulas cuya orientación a derecha e izquierda está en la dirección convencional de terminal amino a terminal carboxi. Además, debería señalarse que un guión en el inicio o final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido. La Tabla anterior está presentada para correlacionar las anotaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer aquí alternativamente.

20 Un "replicón" es un elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de réplica de ADN *in vivo*, esto es, capaz de réplica bajo su propio control.

25 Un "vector" es un replicón, tal como plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN para provocar la réplica del segmento unido. La molécula de "ADN" se refiere a la forma polimérica de deoxiribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina), en su forma de única hebra, o una hélice de doble hebra. Este término se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no lo limita a cualquier forma particular terciaria. De este modo, el término incluye ADN de doble hebra encontrado, entre otros, en molécula de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. En el análisis de la estructura de moléculas particulares de ADN de doble hebra, las secuencias pueden describirse aquí de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3' en la dirección a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (esto es, la hebra que tiene una secuencia homóloga al mRNA).

30 Un "origen de réplica" se refiere a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

35 Una "secuencia codificadora" de ADN es una secuencia de ADN de doble hebra que se transcribe y traslada a un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan por un codón de inicio en la terminal 5' (amino) y un codón de parada de traslación en la terminal 3' (carboxi). Una secuencia codificadora puede incluir, aunque no se limita a, secuencia procarióticas, cADN de mRNA eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, mamífero), e incluso secuencias de ADN sintético. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de transcripción normalmente estarán situadas 3' a la secuencia codificadora.

40 Las secuencias de control transcripcional y traslacional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificadora en una célula huésped.

45 Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de enlazar polimerasa de ARN en una célula e iniciar transcripción de una secuencia codificadora corriente abajo (dirección 3'). Para fines descriptivos de la presente invención, la secuencia promotora está limitada en su terminal 3' por el sitio de iniciación de transcripción y se extiende corriente arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en niveles detectable por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de transcripción (convenientemente definido por el mapeo con nucleasa S1), así como dominios de enlace de proteína (secuencias de consenso) responsables del enlace de polimerasa ARN. Los promotores eucarióticos a menudo, aunque no siempre, contendrán cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procarióticos contienen secuencias Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

50 Una "secuencia de control de expresión" es una secuencia de ADN que controla y regular la transcripción y traslación de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificadora está "bajo el control" de las secuencias de control transcripcional y traslacional en una célula cuando la polimerasa ARN transcribe la secuencia codificadora a mRNA, que después se traslada a la proteína codificada por la secuencia codificadora.

55 Una "secuencia de señal" puede incluirse antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido de señal, N-terminal con el polipéptido, que comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido al medio, y este péptido de señal cortada por la célula huésped antes de que la proteína abandone la célula. Las secuencias de señal pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas nativas a procariotas y eucariotas.

El término "oligonucleótido" como aquí se usa en referencia a sondas de la presente invención, se define como una molécula formada por dos o más ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y uso final del oligonucleótido.

5 El término "cebador" como aquí se usa se refiere a un oligonucleótido, ya ocurra naturalmente como en una digestión de restricción purificada o se produzca sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de síntesis cuando se coloca bajo condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es complementario a una hebra de ácido nucleico, esto es, en la presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una polimerasa de ADN y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser de hebra única o de doble hebra y debe ser lo suficientemente largo como para preparar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente del cebador y uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador de oligonucleótido contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

20 Los cebadores aquí se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarios para diferentes hebras de una secuencia de ADN particular diana. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras. Por lo tanto, la secuencia del cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, con el resto de la secuencia del cebador siendo complementaria a la hebra. Alternativamente, las bases no complementarias o secuencias más largas pueden intercalarse en el cebador, siempre y cuando la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la hebra con la que se hibrida y de este modo forme la plantilla para la síntesis del producto de extensión.

25 Como aquí se usan, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN de doble hebra en o cerca de una secuencia específica de nucleótido.

30 Una célula se ha "transformado" mediante ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN transformador puede o no puede integrarse (unido covalentemente) en ADN cromosomal constituyendo el genoma de la célula. En procariontes, levadura y células de mamíferos por ejemplo, el ADN transformador puede mantenerse en un elemento episomal tal como plásmido. Con respecto a células eucarióticas, una célula establemente transformada es una en la que el ADN transformador se ha integrado en un cromosoma de manera que se hereda por célula hijas a través de la réplica de cromosomas. Esta estabilidad se demuestra por la habilidad de la célula eucariótica para establecer líneas celulares o clones formados por una población de células hijas que contienen el ADN transformador. Un "clon" es una población de células derivadas de una célula sencilla o especie primitiva común mediante mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaría que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

40 Dos sustancias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 75% (preferentemente al menos aproximadamente 80%, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 o 95%) de los nucleótidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software estándar disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones estrictas como se define para este sistema particular. La definición de condiciones apropiadas de hibridación está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis et al., supra: DNA Cloning, Vols. I y II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra. En particular, las secuencias de región variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la presente divulgación son sustancialmente homólogos a una correspondiente secuencia genética de línea germinal, que tiene al menos aproximadamente 90% homología con una correspondiente secuencia genética de línea germinal.

55 Debería apreciarse que también se encuentran dentro del alcance de la presente invención secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la divulgación, o un análogo peptídico, hapteno o fragmento activo del mismo, que codifica un péptido que define al menos una parte del mismo, o tiene la misma secuencia de aminoácido que la expuesta en la FIGURAS 5-6, pero que están degeneradas para las mismas SEQ ID NOS. Por "degenerado para" se entiende que se usa un codón diferente de tres letras para especificar un aminoácido particular. Es bien conocido en la técnica que los siguientes codones pueden usarse intercambiabilmente para codificar cada aminoácido específico:

60	Fenilalanina (Fen o F)	UUU o UUC
	Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
	Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
	Metionina (Met o M)	AUG
65	Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
	Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU O AGC

ES 2 451 993 T3

	Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
	Treonina (Tre o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
	Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
5	Tirosina (Tir o Y)	UAU o UAC
	Histidina (His o H)	CAU o CAC
	Glutamina (Gln o Q)	CCA o CAG
	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
	Lisina (Lis o K)	AAA o AAG
10	Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
	Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
	Cisteína (Cis o C)	UGU o UGC
	Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
	Glicina (Gli o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
15	Triptófano (Trp o W)	UGG
	Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Debería entenderse que los codones especificados anteriormente son para secuencias de ARN. Los codones correspondientes para ADN tienen una T sustituida por U.

20 Las mutaciones pueden hacerse en una secuencia particular de ADN o molécula de manera que un codón particular se cambie a un codón que codifica un aminoácido diferente. Tal mutación generalmente se hace haciendo los mínimos cambios posibles de nucleótidos. Una mutación de sustitución de este tipo puede hacerse para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservadora (esto es, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño particular o característico de un aminoácido que pertenece a otra agrupación) o de una manera conservadora (esto es, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño particular o característico de un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Tal cambio conservador generalmente lleva a menos cambios en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador tiene más posibilidades de alterar la estructura, actividad o función de la proteína resultante. La presente invención debería considerarse que incluye 25 secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran de manera significativa las características de actividad o enlace de la proteína resultante.

30 Lo siguiente es un ejemplo de varias agrupaciones de aminoácidos:

35 Aminoácidos con grupos R no polares

Alanina
Valina
Leucina
40 Isoleucina
Prolina
Fenilalanina
Triptófano
Metionina

45 Aminoácidos con grupos R polares sin carga

Glicina
Serina
50 Treonina
Cisteína
Tirosina
Asparagina
Glutamina

55 Aminoácidos con grupos R polares con carga (con carga negativa en pH 6,0)

Ácido aspártico
60 Ácido glutámico

Aminoácidos básicos (con carga positiva en pH 6,0)

Lisina
Arginina
65 Histidina (en pH 6,0)

Otra agrupación pueden ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo:

5 Fenilalanina
Triptófano
Tirosina

Otra agrupación puede ser de acuerdo con el peso molecular (esto es, tamaño de grupos R)

10	Glicina	75
	Alanina	89
	Serina	105
	Prolina	115
	Valina	117
	Treonina	119
15	Cisteína	121
	Leucina	131
	Isoleucina	131
	Asparagina	132
	Ácido aspártico	133
20	Glutamina	146
	Lisina	146
	Ácido glutámico	147
	Metionina	149
	Histidina (en pH 6,0)	155
25	Fenilalanina	165
	Arginina	174
	Tirosina	181
	Triptófano	204

30 Las sustituciones particularmente preferentes son:

- Lis por Arg y viceversa de manera que pueda mantenerse una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa de manera que pueda mantenerse una carga negativa;
- Ser por Tre de tal manera que pueda mantenerse un -OH libre; y
- 35 - Gln por Asn de tal manera que pueda mantenerse un NH₂ libre.

40 Las sustituciones de aminoácido pueden también introducirse para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferente. Por ejemplo, puede introducirse un Cis como un sitio potencial para puentes de disulfuro con otro Cis. Puede introducirse un His como un sitio particularmente "catalítico" (esto es, His puede actuar como un ácido o bs y es el aminoácido más común en catálisis bioquímica). Pro puede introducirse debido a su estructura particularmente plana, lo que induce giros β en la estructura de la proteína.

45 Dos secuencias de aminoácido son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70% de los residuos de aminoácido (preferentemente aproximadamente el 80%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90% o 95%) son idénticos, o representan sustituciones conservadoras. En particular, las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la presente divulgación son sustancialmente homólogas a una correspondiente secuencia de aminoácido genética de línea germinal, que tiene al menos aproximadamente el 90%, y preferentemente al menos aproximadamente el 95% de homología con una correspondiente secuencia de aminoácido genética de línea germinal.

50 Una región "heteróloga" de la construcción de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula más grande de ADN que no se encuentra en asociación con la molécula más grande por naturaleza. De este modo, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen normalmente estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es una construcción donde la propia secuencia codificadora no se encuentra por naturaleza (por ejemplo, un cADN donde la secuencia codificadora genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a los del gen nativo). Las variaciones alélicas o hechos mutacionales que ocurren de manera natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como aquí se define.

60 Como aquí se usa, el término "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de la misma, que se enlaza con un epítipo específico. El término pretende abarcar anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, los últimos mencionados descritos con más detalle en las Patentes de Estados Unidos Números 4.816.397 y 4.816.567. Tales anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales preparados mediante técnicas genéricas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos y quiméricos, y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades amoldándolos para uso diagnóstico adicional junto con su capacidad de actividad moduladora, por ejemplo, que estimula la remielinización y/o regeneración de axones del

SNC, o que proporciona neuroprotección. Un "sitio que combina anticuerpo" es aquella parte estructural de una molécula de anticuerpo formada por regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que específicamente se enlaza con antígeno. La frase "molécula de anticuerpo" en sus varias formas gramaticales como aquí se usa contempla una molécula de inmunoglobulina intacta y una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina. Moléculas de anticuerpo ejemplares son molécula de inmunoglobulina intacta, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intacta y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

Las partes Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo, o fragmentos de anticuerpo, pueden prepararse mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, o molécula de anticuerpo sustancialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.342.566 de Theofilopolous et al. Las partes de molécula de anticuerpo Fab' son también bien conocidas y se producen a partir de partes F(ab')₂ seguido de reducción de enlaces de disulfuro uniendo las partes de cadena pesada con mercaptoetanol, y seguido de alquilación de la proteína mercaptano resultante con un reactivo tal como iodo acetamida. Aquí es preferente un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intacto.

La frase "anticuerpo monoclonal" en sus varias formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que solamente tiene una especie de sitio que combina con anticuerpo capaz de inmunoreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal de este modo muestra típicamente una única afinidad de enlace para un antígeno con el que inmunoreacciona. Un anticuerpo puede contener por lo tanto una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios que combinan anticuerpos, cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

La metodología general para hacer anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares inmortales, productoras de anticuerpos también pueden crearse mediante técnicas diferentes a la fusión, tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas!" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); véase también Patentes Números 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570, 4.466.917, 4.472.500, 4.491.632, 4.493.890.

Descripción General

De acuerdo con la presente divulgación puede emplearse biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican con más detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, R. M. ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotides Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)], "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Paneles de anticuerpos monoclonales útiles en los métodos de la presente divulgación o producidos contra péptidos de agente neuromodulador o péptidos de autoanticuerpo pueden cribarse para varias propiedades; esto es, isotipo, epítipo, afinidad, etc. Son de particular interés anticuerpos monoclonales que muestran la misma actividad que los agentes neuromoduladores, y particularmente los autoanticuerpos presentes. Tales monoclonales pueden identificarse fácilmente en ensayos de actividad tales como el virus Theilers, EAE y modelos de isolecitina aquí presentes e ilustrados. Los anticuerpos de alta afinidad también son útiles cuando es posible purificación por inmunoafinidad de autoanticuerpos nativos o recombinantes.

Preferentemente, el anticuerpo usado en los métodos de diagnóstico y métodos terapéuticos de esta divulgación es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. El anticuerpo usado en la presente invención es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, se contempla que las moléculas de anticuerpo aquí usadas estén en la forma de Fab, Fab', F(ab')₂ o partes de F(v) de las moléculas de anticuerpo completas.

Como se ha sugeridos anteriormente, el método de diagnóstico de la presente divulgación comprende examinar una muestra o medio celular por medio de un ensayo que incluye una cantidad efectiva de un antagonistas para un péptido/proteína de anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-péptido, preferentemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferentemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-péptido aquí usadas estén en la forma de Fab, Fab', F(ab')₂ o partes de F(v) de las moléculas de anticuerpo completas. Como se ha analizado previamente, los pacientes capaces de beneficiarse de este método incluyen aquellos que sufren una condición neurológica tal como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, una infección viral u otro desequilibrio neuropatológico similar, incluyendo daño resultante de trauma físico. Los métodos para aislar los péptidos e inducir anticuerpo anti-péptido y para determinar y optimizar la habilidad de anticuerpos anti-péptidos para ayudar en el examen de las células dianas son bien conocidos en la técnica.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales anti-polipéptido son bien conocidos en la técnica. Véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.493.795 de Nestor et al. Un anticuerpo monoclonal, que típicamente contiene Fab y/o partes de (ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, pueden prepararse usando la tecnología de hibridoma descrita en *Antibodies – A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988). En resumen, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, un mieloma y otra línea celular que se autoperepetúa se fusiona con linfocitos obtenidos del bazo de un hiperinmunizado mamífero con una parte del mismo que se enlaza con el péptido de anticuerpo, o el péptido de anticuerpo o fragmento, o una parte del mismo que se enlaza con ADN de origen específico.

Los esplenocitos se fusionan típicamente con células de mieloma usando glicol de polietileno (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan por su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de esta invención se identifican por su habilidad para inmunoreaccionar de la misma manera que los autoanticuerpos presentes y su habilidad por inhibir o promover actividad específica en células y tejidos dianas.

Un anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden producirse iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene bajo condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo al medio. El medio que contiene el anticuerpo se recoge después. Las moléculas de anticuerpo pueden después aislarse mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado e incluyen medios de cultivo sintético, ratones endogámicos y similares. Un medio sintético ejemplar es medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., *Virology* 8:396 (1959)) complementado con 4,5 g/l glucosa, 20 mm glutamina y 20% suero fetal de ternero. Una cepa de ratón endogámica ejemplar es la Balb/c.

Los métodos para producir anticuerpos anti-péptido también son bien conocidos en la técnica. Véase Niman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4949-4953 (1983). Típicamente, los presentes péptidos de anticuerpo, o un análogo o fragmento peptídico, se usa solo o conjugado con un transportador inmunogénico, como el inmunógeno en el procedimiento antes descrito para producir anticuerpos monoclonales anti-péptido. Los hibridomas se criban para la habilidad de producir un anticuerpo que inmunoreaccione con el análogo peptídico de anticuerpo y de este modo reaccione de manera similar a los anticuerpos usados en la presente invención.

En la producción de anticuerpos, el cribado para el anticuerpo deseado puede realizarse mediante técnica conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoenzimático), inmunoensayo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ (usando etiquetas de oro coloidal, enzima o radioisótopo, por ejemplo), ensayo de transferencia Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de hemaglutinación, ensayos de fijación con complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunolectroforesis. En un aspecto, se detecta enlace de anticuerpo al detectar una etiqueta en el anticuerpo primario. En otro aspecto, el anticuerpo primario se detecta al detectar enlace de un anticuerpo reactivo secundario para el anticuerpo primario. En un aspecto adicional, el anticuerpo secundario se etiqueta. En la técnica se conocen muchos medios para detectar enlace en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los anticuerpos pueden detectarse para detección *in vitro*, por ejemplo, con etiquetas tales como enzimas, fluoróforos, cromóforos, radioisótopos, tintes, oro coloidal, partículas de látex y agentes quimioluminiscentes. Alternativamente, los anticuerpos pueden etiquetarse para detección in vivo, por ejemplo, con radioisótopos (preferentemente tecnecio o yodo); reactivos de desplazamiento de resonancia magnética (tales como gadolinio y manganeso); o reactivos radio-opacos.

Las etiquetas más comúnmente empleadas para estos estudios son elementos radioactivos, enzimas, sustancias químicas con fluorescencia cuando se exponen a luz ultravioleta y otros. Se conocen un número de materiales fluorescentes y pueden utilizarse como etiquetas. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. Un material detector particular es anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína a través de isotiocianato. El polipéptido también puede etiquetarse con un elemento radioactivo o con una enzima. La etiqueta radioactiva puede detectarse mediante cualquiera de los procedimientos de conteo actualmente disponibles. El isótopo preferente puede seleccionarse de ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I y ¹⁸⁶Re.

Las etiquetas de enzima son útiles de la misma manera, y pueden detectarse mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas presentemente utilizadas. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada mediante reacción con moléculas puente tales como carabodiimidias, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas que pueden usarse en

5 estos procedimientos son conocidas y pueden utilizarse. Las preferentes son peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las Patentes de Estados Unidos Números 3.654.090; 3.850.752 y 4.016.043 son referidas a modo de ejemplo para su divulgación de material y métodos alternativos de etiquetado.

10 Las preparaciones de inmunoglobulina policlonal han demostrado ejercer un efecto clínico beneficioso en varias situaciones clínicas que se caracterizan o van acompañadas por una disfunción o desregulación del sistema inmune. La inmunoglobulina también se usa para prevenir o tratar algunas enfermedades que pueden darse cuando un individuo no produce suficiente de su propia inmunidad para prevenir estas enfermedades. Casi todas las preparaciones de inmunoglobulina en uso hoy en día están formadas por Ig altamente purificado, derivado de grandes grupos de plasma humano mediante fraccionación. Estas preparaciones se administran comúnmente intravenosamente (IVIG), aunque también se usa la administración intramuscular (IGIM) y administración oral.

15 Las preparaciones IgG comúnmente usadas incluyen Gamimune (5% y 10%) (Bayer Corporation), Gammagard (Baxter Healthcare Corporation), Polygam (American Red Cross), Sandoglobin (Sandoz Pharmaceuticals), Venoglobin (Alpha Therapeutic) e Intraglobin (Biotest Pharma GmbH). Una inmunoglobulina intramuscular (IGIM), BayGam, está disponible en Bayer Corporation. Las preparaciones IVIG en uso clínico contienen predominantemente IgG, cantidades más pequeñas de IgA, y cantidades aún más pequeñas de IgM, IgE e IgD, y generalmente comprenden el 95% o más IgG, 2-5% IgA y cantidades trazas de IgM.

20 Pentaglobin (Biotest Pharma GmbH) es una preparación de inmunoglobulina polivalente enriquecida con IgM y cada ml de solución comprende: IgM 6 mg; IgA 6 mg; IgG 38 mg y monohidrato de glucosa para inyección 27,5 mg; o 12% IgM, generalmente 10-15% IgM. Las preparaciones de inmunoglobulina que además se han enriquecida para IgM pueden generarse fácilmente y se han presentado como efectivas en modelos animales para el tratamiento o alivio de ciertas condiciones. Riebert et al. presenta el uso de inmunoglobulina intravenosa humana enriquecida con IgM en un modelo de rata de inflamación severa, particularmente el uso de Pentaglobin y una preparación de laboratorio de IVIgM (35 g/l IgM, 12 g/l IgA, 3 g/l IgG). (Riebert, R. et al. (1999) Blood 93(3):942-951). Hurez et al presenta el uso de una preparación IgM intravenosa de más del 90% en uveítis autoinmune experimental (UAE) (Hurez, V. et al (1997) Blood 90(10):4004-4013). Las preparaciones de inmunoglobulina de anticuerpo IgM de al menos 20% por peso IgM se describen en las Patentes de Estados Unidos Números 5.256.771, 5.510.465 y 5.612.033. Las preparaciones de inmunoglobulina policlonal intravenosamente administrable que contienen al menos 50% por peso de IgM en términos del contenido total de inmunoglobulina se describen en Moller et al en la Patente de Estados Unidos N° 5.190.752.

35 Las preparaciones de inmunoglobulina se generan mediante métodos y procesos generalmente bien conocidos para aquellos expertos en la técnica. Las inmunoglobulinas se preparan a partir de sangre de voluntarios sanos, donde el número de donantes de sangre es al menos aproximadamente 5 o 10; preferentemente al menos aproximadamente 100; más preferentemente al menos aproximadamente 1.000; aún más preferentemente al menos aproximadamente 10.000. En un método común, plasma humano derivado de grupos de cientos de donantes se fracciona mediante fraccionación con etanol frío (el proceso Cohn o proceso Cohn-Oncley) (Cohn et al (1946) J. Am. Chem. Soc. 68:459-475; Oncley, et al (1949) J. Am. Chem. Soc. 71:541-550) seguido de tratamiento enzimático a pH bajo, fraccionación y cromatografía. La fraccionación con etanol frío puede también estar seguida por ultrafiltración y cromatografía de intercambio de iónico. Se incorporan más etapas para hacer que las preparaciones de inmunoglobulinas sean seguras de transmisión viral, incluyendo aunque sin limitar a modificación enzimática, modificación química, tratamiento con beta-propiolactona, tratamiento a pH bajo, tratamiento a calor alto y tratamiento con disolvente/detergente. El tratamiento con una mezcla orgánica de disolvente/detergente (D/D) elimina la transmisión viral mediante virus con envoltura (VIH, hepatitis B, hepatitis C) (Gao, F. et al (1993) Vox Sang 64(4):204-9; Patentes de Estados Unidos Números 4.481.189 y 4.540.573). Los procesos y métodos particulares para preparación de soluciones de inmunoglobulina enriquecida con IgM se describen en las Patentes de Estados Unidos Números 4.318.902 y 6.136.132.

50 Las preparaciones de inmunoglobulina enriquecidas con IgM policlonal aquí contempladas y adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención pueden hacerse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos usados para preparar preparaciones de inmunoglobulina. La preparación de inmunoglobulina puede ser una preparación de inmunoglobulina humana. Las preparaciones de inmunoglobulina adecuadas incluyen al menos aproximadamente 10% de IgM, al menos aproximadamente 15% de IgM, al menos aproximadamente 20% de IgM, al menos aproximadamente 25% de IgM, al menos aproximadamente 30% de IgM, al menos aproximadamente 40% de IgM, al menos aproximadamente 50% de IgM, al menos aproximadamente 60% de IgM, al menos aproximadamente 70% de IgM, al menos aproximadamente 80% de IgM, al menos aproximadamente 90% de IgM y al menos aproximadamente 95% de IgM. Preparaciones de inmunoglobulina IgM monoclonal adecuadas para su uso en la presente invención incluyen más del 10% de IgM, más del 20% de IgM y más del 50% de IgM. Preparaciones de inmunoglobulina IgM monoclonal adecuadas para su uso en la presente invención incluyen una cantidad de IgM que es superior a la cantidad de IgG y superior a la cantidad de IgA.

65 Las preparaciones de fragmentos de inmunoglobulinas enriquecidas con IgM, particularmente inmunoglobulinas humanas también pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos de

inmunoglobulinas se refieren a partes de inmunoglobulinas intactas tales como Fc, Fab, FAb', F(ab)'2 e inmunoglobulinas o monómeros de cadena sencilla.

5 La preparación de inmunoglobulina enriquecida con IgM se proporciona preferentemente en un transportador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y se administra intravenosamente, intermuscularmente u oralmente. La inmunoglobulina IgM se administra en dosis y cantidades similares a la administración reconocida y utilizadas por el experto en la técnica para la administración de inmunoglobulinas clínicamente adoptadas, incluyendo IVIG o IGIM o Pentaglobin, o como clínicamente o por parte del fabricante se instruya o aconseje. De acuerdo con un aspecto central de la divulgación, las preparaciones de IgM recombinante se administran en dosis como se determinó en ratones, de desde aproximadamente 500 ng a aproximadamente 600 µg. Al ajustar estas cantidades para su adaptación a humanos, teniendo en cuenta el tamaño del sujeto y diferencias en superficie a volumen, el rango aproximado sería de desde aproximadamente 1,25 a aproximadamente 2,5 µg/kg de peso corporal. La administración puede realizarse en una única dosis o en múltiples dosis separadas o divididas al día o durante el curso de días o meses. Las dosis adecuadas incluyen 1,25 µg/kg de peso corporal, 1,3 µg/kg de peso corporal, 1,4 µg/kg de peso corporal, 1,5 µg/kg de peso corporal, 1,5 µg/kg de peso corporal, 1,6 µg/kg de peso corporal, 1,7 µg/kg de peso corporal, 1,8 µg/kg de peso corporal, 1,9 µg/kg de peso corporal, 2,0 µg/kg de peso corporal, 2,1 µg/kg de peso corporal, 2,2 µg/kg de peso corporal, 2,3 µg/kg de peso corporal, 2,4 µg/kg de peso corporal y 2,5 µg/kg de peso corporal. Las preparaciones de inmunoglobulina IgM policlona pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos, incluyendo aunque sin limitar a otros compuestos o agentes para el tratamiento o alivio de la condición. En el caso de tratamiento o alivio de una enfermedad desmielinizante, esclerosis múltiple en particular, la inmunoglobulina IgM puede administrarse con antiinflamatorios, esteroides, Betaseron, Copaxone, etc.

25 Por consiguiente, en un aspecto de la aplicación diagnóstica de la presente divulgación, se desvela un método para detectar la presencia de actividad de un agente neuromodulador, comprendiendo el agente neuromodulador un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, un análogo peptídico, un hapteno, monómeros de los mismos, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos y combinaciones de los mismos, teniendo dicho agente neuromodulador una o más de las siguientes características: inducir remielinización; enlazar con tejido neural; promover señalización Ca⁺⁺ con oligodendrocitos; y, opcionalmente, promover proliferación celular de células gliales; donde dicho agente neuromodulador se mide:
 30 A) contactando una muestra biológica de un mamífero en la que se sospecha la presencia o actividad de dicho agente con una pareja de enlace de dicho agente neuromodulador bajo condiciones que permiten que ocurra el enlace de dicho agente neuromodulador con dicha pareja de enlace; y
 B) detectar si el enlace ha ocurrido entre dicho agente neuromodulador de dicha muestra y la pareja de enlace;
 35 donde la detección del enlace indica la presencia o actividad del agente neuromodulador en la muestra.

En un aspecto variante, la divulgación se extiende a un método para detectar la presencia y actividad de un ligando polipéptido asociado con un estímulo invasivo dado en mamíferos que comprende la detección de la presencia o actividad de un agente neuromodulador como se ha expuesto anteriormente, donde la detección de la presencia o actividad del agente neuromodulador indica la presencia y actividad de un ligando polipéptido asociado con un estímulo invasivo dado en mamíferos. En un aspecto particular, el estímulo invasivo es una infección, y puede seleccionarse de infección viral, infección de protozoos, infección bacteriana, células tumorales de mamífero y toxinas.

45 En un aspecto adicional, la divulgación se extiende a un método para detectar los sitios de enlace para un agente neuromodulador, comprendiendo dicho agente neuromodulador un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, incluyendo anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de los mismos, un análogo peptídico, un hapteno, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos, teniendo dicho agente neuromodulador una o más de las siguientes características: inducir remielinización; enlazar con tejido neural; promover señalización Ca⁺⁺ con oligodendrocitos; y, opcionalmente, promover proliferación celular de células gliales; dicho método comprende:
 50 A. colocar una muestra de agente neuromodulador etiquetado en contacto con una muestra biológica de un mamífero en el que se sospechan los sitios de enlace para dicho agente neuromodulador;
 B. examinar dicha muestra biológica en los estudios de enlace para la presencia de dicho agente neuromodulador etiquetado;
 55 donde la presencia de dicho agente neuromodulador etiquetado indica un sitio de enlace para un agente neuromodulador.

Además, la divulgación incluye un método para probar la habilidad de un fármaco u otra entidad para modular la actividad de un agente neuromodulador, comprendiendo dicho agente un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, incluyendo anticuerpos del subtipo IgM, un análogo peptídico, un hapteno, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos, cuyo método comprende:
 60 A. cultivar una colonia de célula de test que tenga un receptor para el agente neuromodulador en un medio de crecimiento que contiene el agente neuromodulador;
 65 B. añadir el fármaco bajo test; y

C. medir la reactividad de dicho agente neuromodulador con el receptor en dicha colonia de células de test; donde dicho agente neuromodulador tiene una o más de las siguientes características:

- a) inducir remielinización;
- b) enlazar con tejido neural, particularmente oligodendrocitos;
- c) promover señalización Ca^{++} con oligodendrocitos; y
- d) promover proliferación celular de células gliales.

Como consecuencia, la divulgación cubre un método de ensayo para cribar fármacos y otros agentes por su habilidad para modular la producción o imitar las actividades de un agente neuromodulador, comprendiendo dicho agente neuromodulador un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, un análogo peptídico, un hapteno, monómeros de los mismos, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos, comprendiendo dicho método:

A. cultivar una colonia de test celular observable inoculada con un fármaco o agente;

B. cosechar un sobrenadante de dicha colonia de test celular; y

C. examinar dicho sobrenadante para la presencia de dicho agente neuromodulador donde un incremento o un descenso en un nivel de dicho agente neuromodulador indica la habilidad de un fármaco para modular la actividad de dicho agente neuromodulador, teniendo dicho agente neuromodulador una o más de las siguientes características:

- i) inducir remielinización;
- ii) enlazar con tejido neural, particularmente oligodendrocitos;
- iii) promover señalización Ca^{++} con oligodendrocitos; y
- iv) promover proliferación celular de células gliales.

Por último, se contempla un kit de test para la demostración de un agente neuromodulador en una muestra celular eucariótica, comprendiendo dicho agente neuromodulador un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, incluyendo anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de los mismos, un análogo peptídico, un hapteno, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos, cuyo kit comprende:

A. una cantidad predeterminada de pareja de enlace específico detectablemente etiquetado de un agente neuromodulador, teniendo dicho agente neuromodulador una o más de las siguientes características: inducir remielinización; enlazar con tejido neural; promover señalización Ca^{++} con oligodendrocitos; y promover proliferación celular de células gliales;

B. otros reactivos; y

C. direcciones para uso de dicho kit.

Se desvela un kit de test variante para demostrar la presencia de un agente neuromodulador en una muestra celular eucariótica, comprendiendo dicho agente un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo, un análogo peptídico, un hapteno, monómeros de los mismos, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, imitadores de los mismos, y combinaciones de los mismos. El kit comprende:

A. una cantidad predeterminada de un agente neuromodulador, teniendo dicho agente neuromodulador una o más de las siguientes características: inducir remielinización; enlazar con tejido neural; promover señalización Ca^{++} con oligodendrocitos; y promover proliferación celular de células gliales;

B. una cantidad predeterminada de una pareja de enlace específica de dicho agente neuromodulador;

C. otros reactivos; y

D. direcciones para uso de dicho kit;

Donde dicho agente neuromodulador o dicha pareja de enlace específico están detectablemente etiquetados. Ambos de los anteriores kits utilizan un componente etiquetado inmunoquímicamente reactivo del grupo consistente en anticuerpos policlonales para el agente neuromodulador, anticuerpos monoclonales para el agente neuromodulador, fragmentos de los mismos y mezclas de los mismos.

La presente divulgación se extiende al uso y aplicación de los anticuerpos de la presente invención, particularmente autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de los mismos, o mezclas y/o fragmentos activos de los mismos, caracterizados por su habilidad para enlazarse con estructuras y células en el sistema nervioso central, incluyendo particularmente oligodendrocitos, en aplicaciones de formación de imágenes y diagnóstico in vivo. De este modo, los anticuerpos, en virtud de su habilidad para enlazarse con estructuras y células en el sistema nervioso central, incluyendo particularmente oligodendrocitos, pueden utilizarse por medio de etiquetas inmunofluorescentes, radioactivas y otras etiquetas diagnósticamente adecuadas como agentes de formación de imágenes o moléculas formadoras de imágenes para la caracterización del sistema nervioso, incluyendo el sistema nervioso central y el diagnóstico, control y valoración de enfermedad nerviosa, incluyendo particularmente esclerosis múltiple. Los anticuerpos pueden además utilizarse como agentes formadores de imágenes o moléculas formadoras de imágenes en el diagnóstico, control y valoración de apoplejía, lesión de la médula espinal y varias demencias que incluyen enfermedad de Alzheimer. Las moléculas o agentes de etiquetado inmunofluorescentes, radiactivos u otros apropiados y adecuados para acoplarse o unirse a los anticuerpos para su uso en formación de imágenes in vivo serán bien conocidos en la experiencia del experto en la técnica.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en métodos para tratar enfermedades desmielinizantes en mamíferos, tales como esclerosis múltiple en humanos, y enfermedades virales del sistema nervioso central de humanos y animales domésticos, tales como encefalomiелitis post-infecciosa. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 puede comprender el anticuerpo humano recombinante aquí descrito como rHlgM22 en combinación con anticuerpos monoclonales SCH 94.03, SCH 79.08, O1, O4, A2B5 y HNK-1, y los autoanticuerpos humanos ebvHlgM MSI19D10, sHlgM46, análogos de los mismos incluyendo haptenos, fragmentos activos de los mismos o un autoanticuerpos natural o sintético que tiene las características de los mismos. También se desvelan métodos de tratamiento profiláctico usando estos mAb, fragmentos activos de los mismos, u otros autoanticuerpos naturales o sintéticos que tienen las mismas características para inhibir la iniciación o progresión de enfermedades desmielinizantes.

Los oligodendrocitos (OLs), las células que forman mielina del sistema nervioso central (SNC), se originan como células neuroectodérmicas de las zonas subventriculares y después migran y maduran para producir mielina. El desarrollo secuencial de OLs se identifica por los marcadores específicos de fase de diferenciación bien caracterizada. Los precursores bipolares proliferativos y migratorios, designados progenitores oligodendrocito/tipo-3 astrocito (O-2A), se identifican mediante anticuerpos monoclonales (mAbs) anti GD3 y A2B5 [Eisenbarth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979), 4913-4917]. La siguiente fase de desarrollo, caracterizada por células multipolares, postmigratorias y proliferativas, se reconoce por mAb O4 [Gard et al., Neuron, 5 (1990), 615-625; Sommer et al., Dev. Biol., 83 (1981), 311-327]. Un desarrollo adicional se define por la expresión de superficie celular de galactocerebrósido, reconocido por mAb O1 [Schachner, J. Neurochem., 39 (1982), 1-8; Sommer et al., supra], y por la expresión de 2'-3'-nucleótido cíclico 3'-fosfohidrolasa. Las células más maduras expresan marcadores de diferenciación terminal tales como proteína básica de mielina y proteína de proteolípido.

Los mAbs (A2B5, O1 y O4) usados para caracterizar fases de desarrollo OL se hicieron inmunizando ratones BALB/c con células de retina de embrión de pollo u homogenado de cuerpo calloso bovino [Eisenbarth et al., supra; Sommer et al., supra]. A2B5 reconoce no solamente progenitores O-2^a sino también reacciona con gangliósido GQ1c de superficie celular [Kasai et al., Brain Res., 277 (1983), 155-158] y otros gangliósido [Fredman et al., Arch. Biochem. Biophys., 233 (1984), 661-666]. O4 reacciona con sulfatido, seminolípido y colesterol [Bansal et al., J. Neurosci. Res., 24 (1989), 548-557], mientras O1 reacciona con galactocerebrósido, monogalactosil-diglicerida y psicósina [Bansal et al., supra]. Estos mAbs pertenecen a la subclase de inmunoglobulina IgM (Ig) y reconocen estructuras citoplásmicas así como los antígenos de superficie de OLs [Eisenbarth et al., supra; Sommer et al., supra]. HNK-1 mAb de ratón (anti-Leu-7), hecho al inmunizar ratones BALB/c con la suspensión de membrana de HSB-2 T células linfoblastoides, se presentó primero como un marcador para células asesinas naturales [Abo et al., J. Immunol. 127 (1981), 1024-1029]. Más tarde, HNK-1 demostró compartir determinantes antigenéticos con el sistema nervioso [Schuller-Petrovic et al., Nature, 306 (1983), 179-181]. El epítopo de carbohidrato en glicoproteína asociada con mielina, encontrada en vainas de mielina central y periférica, demostró ser un antígeno principal de tejido nervioso que reaccionó con HNK-1 [McGarry et al., Nature, 306 (1983), 376-378]. Sin embargo, otras glicoproteínas en el tejido nervioso reaccionan con este mAb, algunas de las cuales son importantes en embriogénesis, diferenciación y mielinización [Keilhauer et al., Nature 316 (1985), 728-730; Kruse et al., Nature, 311 (1984), 153-155; Kruse et al., Nature, 316 (1985), 146-148; McGarry et al., J. Neuroimmunol, 10 (1985), 101-114]. De interés, HNK-1 también reacciona con estructura citoplásmicas y pertenece a la subclase IgM.

Se descubrió que un anticuerpo monoclonal, desvelado y reivindicado por ciertos de los inventores de la presente solicitud en la Patente de Estados Unidos N° 5.591.629, cuyo anticuerpo se designa SCH94.03, promueve la remielinización del SNC en ratones infectados crónicamente con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (VEMT) [Miller et al., J. Neurosci., 14 (1994), 6230-6238]. SCH94.03 pertenece a la subclase Ig de IgM (x) y reconoce un antígeno de superficie desconocido en OLs, pero antígenos citoplásmicos en todas las células (Asakura et al., Molecular Brain Research, en prensa). La polireactividad de SCH94.03 por ELISA, y las secuencias de línea germinal de región variable Ig no mutadas indicaron que SCH94.03 es un anticuerpo natural [Miller et al., J. Neurosci., 14 (1994), 6230-6238]. Un estudio cercano de SCH94.03, y la comparación del mismo con mAbs A2B5, O1, O4 y HNK-1 reactivos con OL bien conocidos dio lugar a la posibilidad de que estos sean autoanticuerpos naturales. Un análisis posterior de las secuencias cADN de región variable Ig y la polireactividad de estos mAbs por ELISA confirmó que éste es un grupo genérico de anticuerpos naturales que tienen utilidades similares.

La reactividad de antígeno del anticuerpo monoclonal, anticuerpo monoclonal IgM aquí referido como SCH94.03 (también referido aquí como SCH94.32) y SCH 79.08 (ambos preparados a partir de un mamífero inmunizado con homogenado de médula espinal de un mamífero normal (es decir, no infectado con cualquier enfermedad desmielinizante)), que se ha caracterizado y descrito en la Patente de Estados Unidos anterior N° 5.591.629 presentada el 29 de abril, 1994, usando varios ensayos bioquímicos y moleculares, incluyendo inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, ensayo de transferencia Western, ensayos inmunoenzimáticos de fase sólida, y secuenciación de región variables Ig. Los hibridomas que producen anticuerpo monoclonal SCH 94.03 y SCH 79.08 se han depositado el 28 de abril, 1994, y 27 de febrero, 1996, respectivamente, bajo los términos del Tratado de Budapest, con la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT) y se han dado los Números de Acceso CACT CRL 11627 y HB12057, respectivamente. Todas las restricciones sobre la disponibilidad del material de depósito se retirarán irrevocablemente tras la concesión de una patente.

Los anticuerpos naturales o fisiológicos están normalmente presentes en suero, se caracterizan por ser reactivos o capaces de enlazarse con las propias estructuras, antígenos o células. A menudo son polireactivos, y con frecuencia del subtipo IgM y se codifican por genes de línea germinal no mutada o son sustancialmente homólogos a genes de línea germinal con pocas o varias diferencias de secuencia. Al secuenciar cADNs de inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales x O1, O4, A2B5 y HNK-1 reactivos con oligodendrocitos y al comparar estos con las secuencias de línea germinal publicadas, se determinó que estos eran autoanticuerpos naturales. O1 V_H fue idéntico a la transcripción A1 del segmento V_H no reorganizado y A4, O4 V_H tenía tres y HNK-1 V_H tenía seis diferencias de nucleótido de V_H101 en la región codificadora V_H. El segmento D de O1 se derivó de la familia genética SP2 de línea germinal, J_H4, mientras O1 J_H se codificó por la línea germinal J_H1 con un cambio de nucleótido silencioso. Las cadenas ligeras de O1 y O4 fueron idénticas al mieloma MOPC21 excepto en un cambio de nucleótido silencioso. HNK-1 V_x fue idéntico a la línea germinal V_x41 excepto en dos cambios de nucleótido silencioso. O1 J_x, O4J_x y HNK J_x se codificaron mediante línea germinal no mutada J_x2. Sin embargo, A2B5 V_H mostró siete diferencias de nucleótido de la línea germinal V1, mientras no se identificó ninguna secuencia de línea germinal codificadora de A2B5 V_x. O1 y O3, pero no A2B5 fueron polireactivos contra múltiples antígenos mediante ELISA directo. Por lo tanto, Igs de O1, O4 y HNK-1 se codifican por genes de línea germinal, y tienen el genotipo y fenotipo de autoanticuerpos naturales.

Tratamiento de Enfermedades Desmielinizantes

Los resultados de los experimentos aquí descritos tienen aplicaciones prácticas para esclerosis múltiple (EM), EAE y otros trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central. Ejemplos raros de remielinización espontánea de tipo SNC ("placas sombra") se encuentran en EM y remielinización ocasional del tipo (PNS) del sistema nervioso periférico se encuentra en placas de la médula espinal desmielinizada cerca de la zona de entrada de raíz. Los oligodendrocitos son infrecuentes en el centro de las placas crónicas en EM pero parecen proliferar en la periferia de las placas, donde se asocian con remielinización abortiva. El proceso de remielinización puede correlacionarse con la remisión espontánea y mejoras observadas clínicamente en EM. Estas observaciones clínicas indican que la formación de nueva mielina es posible en EM. La remielinización que se ha estimulado en ratones con desmielinización inducida por TMEV al usar mAb mantiene la promesa para aplicaciones terapéuticas en esclerosis múltiple.

De importancia clínica es la cuestión de si la regeneración morfológica de vainas finas de mielina contribuye a la recuperación funcional. Las simulaciones con ordenador indican que la formación de nueva mielina incluso mediante vainas inapropiadamente finas mejora la conducción de impulso. Ya que la membrana de axón de fibras normalmente mielinizadas está muy diferenciada, es necesario que estén presentes canales de sodio en alta densidad en el nodo de Ranvier para propagar una conducción de bienvenidas. La evidencia experimental sugiere que los nodos recién formados sí desarrollan una alta densidad de canal de sodio como lo demuestra en enlace de saxitoxina. Los datos hasta la fecha sugieren que la remielinización incluso mediante mielina inapropiadamente fina mejora la conducción en un axón previamente desmielinizado. Por lo tanto, cualquier estrategia para promover este fenómeno morfológico tiene el potencial de producir recuperación funcional.

Los datos aquí presentados demuestran que la administración de un anticuerpo monoclonal humano recombinante a un mamífero es capaz de estimular la remielinización del sistema nervioso central in vivo. Específicamente, el tratamiento de ratones infectados con TMEV crónicamente infectados con tan poco como 500 ng de rHlgM22 dio como resultado un significativo incremento en el área total de mielinización del SNC en comparación con ratones tratados con un mAb control.

El uso de anticuerpos humanos evita el potencial de respuesta inmune humana contra el anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos terapéuticos derivados de animales no humanos han demostrado generar una respuesta inmune, lo que puede ser significativo y perjudicial para el individuo. Por consiguiente, IgM humano policlonal e IgG humano policlonal se han probado en dos modelos de desmielinización de médula espinal *in vivo*; un modelo de infección viral crónica, y un modelo de toxicidad severa. En ambos modelos los animales tratados con IgM policlonal humano tuvieron un densidad significativamente mayor de axones recién mielinizados que animales tratados con IgG policlonal humano. También se ha identificado un panel de anticuerpos IgM monoclonales humanos, en base a su reactividad con antígenos de superficie específicos para el sistema nervioso central. Estos anticuerpos humanos promueven significativamente más remielinización del sistema nervioso central que IgG policlonal humano cuando se dan a mamíferos con enfermedad desmielinizante. Los anticuerpos monoclonales humanos son antigenéticamente polireactivos y reconocen determinantes sobre la superficie de oligodendrocitos y poblaciones específicas de neuronas. Las regiones variables de cadena ligera y pesada de varios anticuerpos humanos que promueven la remielinización se han secuenciado. En particular, estos anticuerpos pueden inducir flujos cálcicos en células gliales (oligodendrocitos y astrocitos) en cultivo, lo que sugiere un enlace directo y una señalización a través de células gliales. Estos anticuerpos humanos se enlazan con materia blanca humana y pueden ser efectivos para promover remielinización en humanos. Los beneficios de un anticuerpo monoclonal recombinante para su uso como un agente terapéutico son 1) el anticuerpo puede crecer libre de posible infección de huésped y 2) el anticuerpo puede alterarse genéticamente *in vitro* para cambiar su efectividad.

De este modo, como resultado de los experimentos aquí descritos, la composición farmacéutica y anticuerpo de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de humanos que sufren trastornos desmielinizantes y para estimular la remielinización y regeneración de los axones del SNC, así como para ofrecer neuroprotección. Como se ha descrito aquí, una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal puede administrarse mediante rutas convencionales de administración, y particularmente, a través de inyección intravenosa (iv) o intraperitoneal (ip). Como aquí se describe, se contemplan composiciones y vacunas terapéuticas y pueden prepararse y administrarse. Una cantidad efectiva de la anticuerpo puede variar dependiendo del tamaño del mamífero que se está tratando, la severidad de la enfermedad, la ruta de administración y el curso de tratamiento. Cada dosis de anticuerpo administrado puede oscilar entre aproximadamente 1,25 y aproximadamente 2,5 µg/kg. La dosis de anticuerpo también dependerá de la ruta de administración. El curso de tratamiento incluye la frecuencia de administración del anticuerpo (por ejemplo, al día, a la semana, o quincenalmente) y al duración del tratamiento (por ejemplo, de cuatro semanas a cuatro meses). De este modo, por ejemplo, una mayor cantidad de mAb puede darse diariamente durante cuatro a cinco semanas, en oposición a una menor cantidad de mAb dada durante cuatro meses.

La efectividad de la cantidad del anticuerpo monoclonal que se está administrando de acuerdo con la reivindicación 1 puede evaluarse usando cualquier número de criterios clínicos, por ejemplo, como se describe aquí en los Ejemplos, incluyendo la apariencia general del mamífero, la actividad del mamífero y la extensión de parálisis del mamífero. La efectividad de la cantidad de anticuerpo monoclonal necesaria para inducir remielinización en humanos de acuerdo con la reivindicación 1 también puede evaluarse en un ensayo doble ciego controlado. Los pacientes con déficits neurológicos fijados de enfermedad desmielinizante pueden tratarse con anticuerpo monoclonal o controles. La mejora en la fuerza muscular isométrica como lo detectan las pruebas musculares de biomecánica cuantitativa podría usarse como el punto final terapéutico primario.

Además de los métodos *in vivo* de promover remielinización, la presente invención también abarca métodos *ex vivo* de estimulación de remielinización en axones del SNC. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede usarse *in vitro* para estimular la proliferación y/o diferenciación de células gliales, tales como oligodendrocitos. Estas células gliales exógenas pueden después introducirse en el SNC de mamíferos usando técnicas conocidas. La remielinización de axones del SNC aumentaría incrementando el número de células gliales endógenas presentes (células gliales, tales como oligodendrocitos juegan un papel crítico en la producción de mielina).

Esta invención también abarca métodos *in vitro* para producir células gliales, o estimular la proliferación de células gliales de cultivo mezclado (por ejemplo, célula de nervio óptico de rata, o cultivos de célula de cerebro de rata). Por ejemplo, células obtenidas de nervio óptico de rata, o cerebro de rata, que contienen célula gliales, se cultivan como un cultivo mezclado bajo condiciones suficientes para promover el crecimiento de las células. Una cantidad efectiva de mAb capaz de promover remielinización de axones del SNC, tales como rHIgM22 o sHIgM46, o SCH94.03 o una combinación de los mismos, se añade después al cultivo mezclado de célula y se mantiene bajo condiciones suficientes para el crecimiento y proliferación de células. El mAb estimula la proliferación de células gliales cultivadas en presencia del mAb incrementado, en relación con la proliferación de células gliales que crecen en ausencia del mAb.

Como se ha declarado anteriormente, el anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 puede administrarse, y preferentemente se administra como medicamento, esto es, composición farmacéutica. Una cantidad efectiva del anticuerpo policlonal IgM puede de este modo combinarse con, o diluirse con, un transportador, diluyente o vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable, tal como tampón fisiológico o solución salina. Una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal puede de este modo combinarse con, o diluirse con, un transportador, diluyente o vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable, tal como tampón fisiológico o solución salina. Una cantidad efectiva de una combinación de uno o más anticuerpos monoclonales pueden similarmente con o diluirse con un transportador, diluyente o vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable. En el caso en el que se vaya a preparar una vacuna, el anticuerpo monoclonal o equivalente activo de la invención puede prepararse con un transportador o adyuvante farmacéuticamente efectivo y adecuado, y el protocolo para su administración puede proceder de acuerdo con procedimientos estándares para inmunización conocidos por aquellos médicos expertos.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención pueden comprender los anticuerpos monoclonales en combinación con un transportador o excipiente farmacéutico. En una realización preferente, la composición farmacéutica puede contener más de uno, preferentemente dos, anticuerpos monoclonales. De este modo, aquí se contemplan composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1 que comprenden, por ejemplo, una cantidad efectiva en combinación de sHIgM22 y sHIgM46. Tales composiciones son ventajosas en el sentido de que la presencia de más de un autoanticuerpo monoclonal potenciará la actividad de otros en la misma composición o método terapéutico.

El medicamento puede tener forma de comprimidos (incluyendo pastillas y gránulos), grageas, cápsulas, pastillas, ampollas y supositorios que comprenden el compuesto de la invención.

- 5 Ventajosamente, las composiciones se formulan como unidades de dosis, estando cada unidad adaptada para suministrar una dosis fija de ingredientes activos. Comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, ampollas y supositorios son ejemplos de formas preferentes de dosis de acuerdo con la invención. Solamente es necesario que el ingrediente activo constituya una cantidad efectiva, esto es, que una dosis efectiva adecuada sea consistente con la forma de dosis empleada en una única o múltiples dosis de unidad. Las dosis individuales exactas, así como las dosis diarias, se determinarán, por supuesto de acuerdo con los principios médicos estándares bajo la dirección e un médico o veterinario.
- 10 Los anticuerpos monoclonales pueden también suministrarse como suspensiones, soluciones y emulsiones del compuesto activo en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, granulados o polvos.
- 15 Los diluyentes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas (por ejemplo, granulados) que contienen el compuesto activo adaptado para formarse en comprimidos, grageas, cápsulas o píldoras incluyen los siguientes: (a) rellenos y sustancias para preservar, por ejemplo, almidón, azúcares, manitol y ácido silícico; (b) agentes aglutinantes, por ejemplo, carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina y polivinil pirrolidona; (c) agentes humectantes, por ejemplo, glicerol; (d) agentes desintegrantes, por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico y bicarbonato sódico; (e) agentes para retardar la disolución, por ejemplo, parafina; (f) aceleradores de reabsorción, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes activos de superficie, por ejemplo, alcohol cetilo, monoestearato de glicerol; (g) transportadores adsorbentes, por ejemplo, caolín y bentonita; (i) lubricantes, por ejemplo, estearato de talco, calcio y magnesio y glicoles de polietileno sólidos.
- 20 Los comprimidos, grageas, cápsulas y píldoras que comprenden el compuesto activo pueden tener los recubrimientos habituales, envolturas y matrices protectoras, que pueden contener opacificantes. Pueden también constituirse para que liberen el ingrediente activo solamente o preferentemente en una parte particular del tracto intestinal, posiblemente durante un periodo de tiempo. Los recubrimientos, envolturas y matrices protectoras pueden estar hechas, por ejemplo, de sustancias poliméricas y ceras.
- 25 Los diluyentes que se usarán en composiciones farmacéuticas adaptadas para formarse en supositorios pueden ser, por ejemplo, los diluyentes habituales solubles en agua, tales como glicoles de polietileno y grasas (por ejemplo, aceite de coco y ésteres altos [por ejemplo, C14-alcohol con ácido graso C16]) o mezclas de estos diluyentes.
- 30 Las composiciones farmacéuticas que son soluciones y emulsiones pueden contener, por ejemplo, los diluyentes habituales (con, por supuesto, la exclusión anteriormente mencionada de disolventes que tienen un peso molecular inferior a 200, excepto en presencia de una agente activo de superficie), tales como disolventes, agentes disolventes y emulsionantes. Ejemplos no limitativos específicos de tales diluyentes son agua, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, acetato etílico, alcohol de bencilo, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1-3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (por ejemplo, aceite de nuez molida, glicerol, tetrahidrofurfuril alcohol , glicoles de polietileno y ésteres de ácido graso de sorbitol o mezclas de los mismos.
- 35 Para administración parental, las soluciones y suspensiones deberían ser estériles, por ejemplo, agua o aceite de cacahuete contenida en ampollas y, si es apropiado, isotónicas a la sangre.
- 40 Las composiciones farmacéuticas que son suspensiones pueden contener los diluyentes usuales, tales como diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, alcohol etílico, propilenglicol, agentes activos de superficie (por ejemplo, alcoholes de isostearilo etoxilados, sorbitoles de polioxietileno y ésteres de sorbitán), celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de los mismos.
- 45 Las composiciones farmacéuticas pueden también contener agentes colorantes y conservantes, así como perfumes y adiciones saborizantes (por ejemplo, aceite de menta y aceite de eucalipto), y agentes endulzantes (por ejemplo sacarina y aspartamo).
- 50 Las composiciones farmacéuticas contendrán generalmente de 0,5 a 90% del ingrediente activo por peso de la composición total.
- 55 Además de los anticuerpos monoclonales, las composiciones y medicamentos farmacéuticos también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos, por ejemplo, esteroides, agentes antiinflamatorios o similares.
- 60 Cualquier diluyente en los medicamentos de la presente divulgación puede ser cualquiera de aquellos mencionados anteriormente en relación con la composición farmacéutica. Tales medicamentos pueden incluir disolventes de peso molecular inferior a 200 como el diluyentes solo.
- 65 Se concibe que los anticuerpos policlonales IgM y anticuerpos monoclonales se administrarán peroralmente, parenteralmente (por ejemplo, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente,

transdérmicamente o intravenosamente), rectalmente o localmente, preferentemente oralmente o parentalmente, especialmente perlingualmente o intravenosamente.

5 El índice de dosis administrada será una función de la naturaleza y peso corporal del sujeto humano o animal que se tratará, la reacción individual de este sujeto al tratamiento, tipo de formulación en la que se administra el ingrediente activo, el modo en el que la administración se realiza y el punto en el progreso de la enfermedad o intervalo en el que se administrará. De este modo, en algún caso puede ser suficiente usar menos de un índice mínimo de dosis, mientras que en otros casos puede excederse un límite superior para conseguir los resultados deseados. Donde se administran mayores cantidades, puede ser aconsejable dividir éstas en varias administraciones individuales durante el curso del día.

10 Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 puede ser adecuada para su introducción parentalmente, intratecalmente, transmucosamente, por ejemplo, oralmente, nasalmente, pulmonarmente o rectalmente o transdérmicamente. Preferentemente, la administración es parental, por ejemplo, por medio de inyección intravenosa, y también se incluyen, aunque no se limitan a, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. La entrega oral o pulmonar puede ser preferente para activar inmunidad de mucosa; ya que las bacterias responsables de las condiciones bajo tratamiento generalmente colonizan la mucosa nasofaríngea y pulmonar, la administración por mucosa puede ser particularmente efectiva como tratamiento. Los términos "dosis de unidad" cuando se usan en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refieren a unidades físicamente distintas adecuadas como dosis unitarias para humanos, conteniendo cada dosis una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; esto es, transportador o vehículo.

15 En otra realización, el compuesto activo puede entregarse a una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Barestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; véase generalmente *ibid.*).

20 En otra realización más, el compuesto terapéutico puede entregarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, *supra*: Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (vease *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy et al., *Science* 228:190 (1989)); en otra realización más, un sistema de liberación controlada puede colocarse en proximidad de la diana terapéutica, esto es, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). Preferentemente, un dispositivo de liberación controlada se introduce en un sujeto en proximidad del sitio de activación inmune inapropiada o un tumor. Otros sistemas de liberación controlada se analizan en el análisis por Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

30 Un sujeto para el que la administración de un componente activo como el expuesto anteriormente es un régimen terapéutico efectivo para una condición o patología asociada con el sistema nervioso central, incluyendo en ciertos caos, infección bacteriana es preferentemente un humano, pero puede ser cualquier animal. De este modo, como puede apreciar fácilmente un experto en la técnica, los métodos y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son particularmente adecuados para su administración a cualquier animal, particularmente un mamífero, e incluyendo, aunque sin limitar a, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, tales como aunque sin limitar a sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes (ya sea en su hábitat natural o en un jardín zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., esto es, para uso médico veterinario.

35 Se proporciona una dosis terapéuticamente efectiva del componente activo en el uso en el tratamiento o prevención detallada en la reivindicación 1 y reivindicación 10. Un trabajador médico experto ordinario puede determinar una dosis terapéuticamente efectiva de acuerdo con la reivindicación 1 en base a características del paciente (edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc.), como es bien conocido en la técnica. Además, como se dirigen más estudios rutinarios, aparecerá más información específica en relación a niveles apropiados de dosis para el tratamiento de varias condiciones en varios pacientes, y el trabajador experto ordinario, considerando el contexto terapéutico, edad y salud general del receptor, es capaz de determinar la dosis apropiada. Generalmente, para inyección o infusión intravenosa, la dosis puede ser inferior a la intraperitoneal, intramuscular, u otra ruta de administración. El programa de dosis puede variar, dependiendo de la vida media de la circulación y la formulación usada. Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosis en la cantidad terapéuticamente efectiva. Las cantidades precisas de ingrediente activo requerido que se administrará dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo. Los regímenes adecuados para administración inicial y refuerzos son también variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida de

dosis repetidas en intervalos de una o más horas por una posterior inyección u otra administración. Alternativamente, se contemplan continuas infusiones intravenosas suficientes para mantener la concentración de diez nanomolares a diez micromolares en la sangre.

5 Administración con otros compuestos

Para el tratamiento de una condición desmielinizante, por ejemplo esclerosis múltiple, se puede administrar el presente componente activo junto con una o más composiciones farmacéuticas usadas para tratar esclerosis múltiples, incluyendo aunque sin limitar a (1) agente antiinflamatorios, tales como esteroides; (2) Betaseron; (3) Copaxone; o (4) (debería ser (4) 9IgM policlonal; 4) (debería ser (5)) metilprednisolona. La administración puede ser simultánea (por ejemplo, administración de una mezcla del presente componente activo y un antibiótico), o puede ser en serie.

Por consiguiente, en una realización específica, las composiciones terapéuticas pueden además incluir una cantidad efectiva del componente activo, y uno o más de los siguientes ingredientes activos: un antibiótico, un esteroide, etc.

También aquí se contempla la entrega pulmonar del presente agente neuromodulador o presentes agentes neuromoduladores, que pueden asociarse con un antiinflamatorio. Los informes de la preparación de proteínas para entrega pulmonar se encuentran en la técnica [Adjei et al. *Pharmaceutical Research*, 7:565-569 (1990); Adjei et al., *International Journal of Pharmacology*, 63:135-144 (1990) (acetato de leuprolide); Braquet et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (Suppl. 5):143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard et al., *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, páginas 206-212 (1989) (α -1-proteinasa); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, Marzo, (1990) (hormona de crecimiento humano recombinante); Debs et al., *J. Immunol.* 140:3482-3488 (1988) (interferón- γ y factor alfa de necrosis tumoral); Platz et al., *Patente de Estados Unidos N° 5.284.656* (factor estimulador de colonia de granulocitos)]. Un método y composición para entrega pulmonar de fármacos se describe en *Patente de Estados Unidos N° 5.451.569*, presentada el 19 de septiembre, 1995 por Wong et al.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación de agente inhibidor de adhesina (o derivado). Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o transportadores usuales útiles en terapia. También, se contempla el uso de liposomas, microcápsula o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de transportadores. El agente inhibidor de adhesina modificado químicamente puede también prepararse en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea a chorro o ultrasónico, típicamente comprenderá un agente neuromodulador (o derivado) disuelto en agua en una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de agente biológicamente activo por ml de solución. La formulación también puede incluir un tampón y una azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización de agente neuromodulador y regulación de presión osmótica). La formulación del nebulizador puede también contener un surfactante, para reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie del agente neuromodulador causada por la atomización de la solución al formar el aerosol.

Las formulaciones para su uso con un dispositivo inhalador de dosis fija generalmente comprenderá un polvo finamente dividido que contiene el agente neuromodulador (o derivado) suspendido en un propulsor con la ayuda de un surfactante. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como clorofluorocarburo, un hidrocloreofluorocarburo, un hidrofloreofluorocarburo o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los surfactantes adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico puede ser también útil como un surfactante.

Las formulaciones líquidas de aerosol contienen agente neuromodulador y un agente dispersante en un diluyente fisiológicamente aceptable. Las formulaciones de polvo seco de aerosol de la presente invención consisten en una forma sólida finamente dividida de agente neuromodulador y un agente dispersante. Con la formulación de aerosol líquida o de polvo seco, la formulación debe convertirse en aerosol. Esto es, debe romperse en partículas líquidas y sólidas con el fin de asegurar que la dosis aerosolizada alcance realmente las membranas de la mucosa de los conductos nasales o el pulmón. Los términos "partícula de aerosol" se usan aquí para describir la partícula líquida o sólida adecuada para administración nasal o pulmonar, esto es, que alcanzará las membranas de la mucosa. Otras consideraciones, tales como la construcción del dispositivo de entrega, componentes adicionales en la formulación y características de partícula son importantes. Estos aspectos de la administración pulmonar de un fármaco son bien conocidos en la técnica, y la manipulación de formulaciones, medios de aerosolización y construcciones de un dispositivo de entrega requieren la máxima experimentación rutinaria de un experto ordinario en la técnica. En una realización particular, el diámetro dinámico medio de masa será 5 micrometros o menos con el fin de asegurar que las partículas del fármaco alcancen los alveolos pulmonares [Wearley, L. L., *Crit. Rev. In Ther. Drug Carrier Systems* 8:333 (1991)].

Los agentes neuromoduladores de la divulgación pueden también prepararse para su administración en forma de vacunas, que pueden comprender como el activo, los autoanticuerpos, análogos peptídicos o haptenos aquí detallados o posiblemente combinaciones de los mismos. De este modo, la preparación de vacunas puede proceder de acuerdo con procedimientos conocidos, y también se contemplan vacunas monovalentes así como polivalentes. También, pueden prepararse vacunas de subunidad de ADN, en base a moléculas de ADN de la invención. Todas las vacunas pueden administrarse de acuerdo con las prácticas estándares del médico o clínico, y se considera que tales parámetros están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los vectores que contienen, por ejemplo, una vacuna con base de ADN de acuerdo con la divulgación pueden introducirse en el huésped deseado mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación con fosfato cálcico, lipofección (fusión de liposomas), uso de una pistola de genes, o un transportador de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu y Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263-14621-14624; Hartmut et al., Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311, presentada el 15 de marzo, 1990).

La vacuna puede administrarse mediante cualquier ruta parenteral, incluyendo aunque sin limitar a intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y similares. Preferentemente, ya que el resultado deseado la vacunación es elucida una respuesta inmune para el antígeno, y de este modo para el organismo patogénico, es deseable la administración directamente, o mediante la selección de un objetivo o elección de un vector viral, indirectamente a tejidos linfáticos, por ejemplo, nodos linfáticos o bazo. Ya que las células inmunes están continuamente replicándose, son dianas ideales para vacunas de ácido nucleico basadas en vector retroviral, ya que los retrovirus requieren células replicantes.

Puede conferirse inmunidad pasiva a un sujeto animal sospechoso de sufrir una enfermedad desmielinizante mediada autoinmune, por ejemplo, esclerosis múltiple, administrando antisuero, anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal neutralizador al paciente. Preferentemente, los anticuerpos administrados para una terapia inmune pasiva son anticuerpos autólogos. Por ejemplo, si el sujeto es un humano, preferentemente los anticuerpos son de origen humano o se han "humanizado", con el fin de minimizar la posibilidad de una respuesta inmune contra los anticuerpos. Las vacunas activas o pasivas de la invención, o la administración de una adhesina, pueden usarse para proteger un sujeto animal de una infección de una bacteria gram positiva, preferentemente estreptococo, y más preferentemente, neumococo.

Además, la presente divulgación contempla el tratamiento mediante terapia de genes, donde el agente neuromodulador apropiado se introduce correspondientemente a células dianas para tratamiento, para causar o incrementar la expresión del agente correspondiente. De este modo, en una realización, el ADN o un gen que codifica el agente neuromodulador, autoanticuerpo, péptido de anticuerpo, etc., o un fragmento de proteína o dominio de polipéptido del mismo se introduce *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando un vector viral o a través de introducción directa de ADN. La expresión en los tejidos dirigidos puede efectuarse dirigiendo el vector transgénico a células específicas, tal como con un vector viral o un ligando receptor, o usando un promotor específico de tejido, o ambos.

Los vectores virales comúnmente usados para dirección *in vivo* o *ex vivo* y procedimientos de terapia son vectores basados en ADN y vectores retrovirales. Los métodos para construir y usar vectores virales son conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Miller y Rosman, BioTechniques 7:890-990 (1992)].

Los vectores virales de ADN incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso, tal como aunque sin limitar a virus del herpes simple (VHS), virus del papiloma, virus de Epstein Barr (VEB), adenovirus, virus adeno-asociados (VAA), y similares. Son preferentes los virus defectuosos, que completamente o casi completamente carecen de genes virales. El virus defectuoso no es infeccioso después de su introducción en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a células en un área específica localizada, sin la preocupación de que el vector pueda infectar otras células. De este modo, puede ser dirigido específicamente a tejido adiposo. Ejemplos de vectores particulares incluyen, aunque no se limitan a, vector del virus del herpes defectuoso 1 (VH1) [Kaplitt et al., Molec. Cell, Neurosci. 2:320-330 (1991)], virus del herpes defectuoso que carece de una gen L de glicoproteína [Publicación de Patente RD 371005 A] u otros vectores de virus del herpes defectuosos [Publicación de Patente Internacional WO 94/21807, publicada el 29 de septiembre, 1994; Publicación de Patente Internacional N° WO 92/05263, publicada el 2 de abril, 1994]; un vector de virus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet et al. [J. Clin. Invest. 90:626-630 (1992); véase también La Salle et al., Science 259:988-990 (1993)]; y un vector de virus adeno-asociado defectuoso [Samulski et al., J. Virol. 61:3096-3101 (1987); Samulski et al., J. Virol. 63:3822-3828 (1989); Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 (1988)].

Preferentemente, para administración *in vivo*, se emplea un tratamiento inmunosupresor apropiado junto con el vector viral, por ejemplo, un vector adenovirus, para evitar la inmuno-desactivación del vector viral y células infectadas. Por ejemplo, pueden administrarse citoquinas inmunosupresoras, tales como interleuquina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ) o anticuerpo anti-CD4, para bloquear respuestas inmunes humorales o celulares a los vectores

virales [véase, por ejemplo, Wilson, Nature Medicine (1995)]. Además, es ventajoso emplear un vector viral que esté diseñado para expresar un número mínimo de antígenos.

5 En otro aspecto el gen de ADN puede introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, como se describe en Anderson et al., Patente de Estados Unidos N° 5.399.346; Mann et al., 1983, Cell 33:153; Temin et al., Patente de Estados Unidos N° 4.650.764; Temin et al., Patente de Estados Unidos N° 4.980.289; Markowitz et al., 1988, J. Virol. 62:1120; Temin et al., Patente de Estados Unidos N° 5.124.263; Publicación de Patente Internacional N° WO 95/07358, publicada el 16 de marzo, 1995, por Dougherty et al.; y Kuo et al., 1993, Blood 82-845. Los vectores retrovirales pueden construirse para funcionar como partículas de infecciones o pueden sufrir una única ronda de transfección. En el último caso, el virus se modifica para mantener todos sus genes excepto aquellos responsables de las propiedades de transformación oncogénica, y para expresar el gen heterólogo. Los vectores virales no infecciosos se preparan para destruir la señal de embalaje viral, pero mantienen los genes estructurales necesarios para embalar el virus co-introducido diseñado para contener el gen heterólogo y las señales de embalaje. De este modo, las partículas virales que se producen no son capaces de producir virus adicional.

15 La entrega de gen dirigido se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 95/28494, publicada en octubre de 1995.

20 Alternativamente, el vector puede introducirse *in vivo* mediante lipofección. Durante la pasada década, ha habido un creciente uso de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros con los que se encuentra la transfección mediada por liposomas pueden usarse para preparar liposomas para transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador. [Felgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417 (1987); véase Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031 (1988); Ulmer et al., Science 259:1745-1748 (1993)]. El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos con carga negativa, y también promover la fusión con membranas celulares con carga negativa [Felgner y Ringold, Science 337:387-388 (1989)]. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. La dirección molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que el dirigir la transfección a tipos particulares de células sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón y el cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con el fin de dirigir las [véase Mackey, et al., supra]. Los péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no-peptídicas podrían acoplarse a liposomas químicamente.

35 También es posible introducir el vector *in vivo* en un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para terapias de genes pueden introducirse en las células deseadas del huésped mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación con fosfato cálcico, uso de un pistola de genes o uso de transportador de vector de ADN [véase, por ejemplo, Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-967 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624 (1988); Hartmut et al., Solicitud de Patente Canadiense 2.012.311 presentada el 15 de marzo, 1990; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991)]. También pueden usarse técnicas de entrega de ADN mediadas por receptor [Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)].

45 En un aspecto preferente de la presente divulgación, un vector de terapia de genes como el descrito anteriormente emplea una secuencia de control de transcripción que comprende la secuencia de consenso de ADN reconocida por, por ejemplo, un autoanticuerpo de la invención, esto es, un sitio de enlace de anticuerpo, operativamente asociado con un gen heterólogo terapéutico insertado en el vector. Esto es, un vector específico de expresión de la invención puede usarse en terapia de genes.

50 La presente invención se entenderá mejor a partir de una consideración de los siguientes ejemplos no limitativos, que describen la preparación de materiales, compuestos y composiciones y el desarrollo y práctica de métodos ilustrativos de la presente invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar con más detalles la invención y sirven también en el cumplimiento del deber del solicitante para presentar el mejor modo conocido para la práctica de la invención, y no deberían interpretarse de ninguna manera como limitativos del amplio alcance de la misma.

55 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio por Rango de Dosis usando sHlgM22 Recombinante (Estudio #1) Ratones

60 A ratones SL/J hembras de 4-6 semanas de edad se les inyectaron intracerebralmente 2×10^5 unidades formadoras de placas de cepa TMEV de Daniel en 10 μ l. Los animales infectados recibieron una única inyección intraperitoneal ((IP) de 500 μ l de rHlgM22 en varias concentraciones, o PBS 6 meses después de la infección de TMEV. Un grupo recibió una dosis adicional de 500 μ l de rHlgM22 después de 5 semanas. Dos grupos de ratones recibieron 2 mg de metilprednisolona una vez cada semana. Se usaron diez ratones para cada grupo. Los animales se eliminaron para análisis cuantitativo de remielinización en las médulas espinales después de 5 ó 10 semanas de tratamiento.

65

Para determinar la dosis mínima efectiva, se realizó un estudio por rango de dosis de RsHIM22 en ratones crónicamente infectados con TMEV. Después de 5 semanas de tratamiento, se retiraron las médulas espinales y se clasificaron para desmielinización y remielinización. Los resultados están directamente presentados en la Figura 1, y una comparación de valores medios de los resultados categorizados para sujetos que reciben la misma dosis, está presentada en la Figura 2.

A partir de un análisis de los resultados, todas las dosis de RsHigM22 por debajo de 0,25 mg/kg dieron como resultado un área significativamente mayor de remielinización que los controles con solución salina ($p < 0,001$ por ANOVA). Esto demuestra la habilidad de los anticuerpos de la invención para ofrecer efectos terapéuticamente relevantes en dosis razonables.

Además, los animales tratados con RsHigM22 y 2 mg de metilprednisolona por semanas presentaron menos desmielinización ($p < 0,001$ por ANOVA) así como una mayor remielinización. Esto es significativo porque los esteroides son un método primario de tratamiento para muchos pacientes con exacerbaciones severas, que serían receptores potenciales de mAbs remielinizante humano. Además, estos resultados sugieren que el aspecto de la invención que pertenece a las preparaciones y administración de una composición que comprende un esteroide tal como metilprednisolona, y los anticuerpos de la invención, o alternativamente la formulación y administración de una composición que comprende el esteroide y el anticuerpo por separado pero administración conjunta o secuencial, puede producir los resultados ventajosos aquí demostrados.

Estos resultados demuestran que RsHigM22 puede actuar en concentraciones en el rango de aquellas requeridas para factores clásicos del crecimiento.

Ejemplo 2: Prueba de Efectividad de rHigM22 solo en dosis inferiores o en combinación con Metilprednisolona (Estudio #2)

Materiales y Métodos

Ratones

A ratones SL/J hembras de 4-6 semanas de edad de los Laboratorios Jackson se les inyectaron intracerebralmente 2×10^5 unidades formadoras de placas de cepa TMEV de Daniel en 10 μ l. Los animales infectados recibieron una única inyección intraperitoneal (IP) de 500 μ l de rHigM22 en varias concentraciones, o PBS 6 meses después de la infección de TMEV. Un grupo recibió una dosis adicional de 500 μ l de rHigM22 después de 5 semanas. Dos grupos de ratones recibieron 1 mg de metilprednisolona dos veces cada semana. Se usaron diez ratones para cada grupo. Los animales se eliminaron para análisis cuantitativo de remielinización en las médulas espinales después de 5 ó 10 semanas de tratamiento.

Aislamiento y secuenciación de anticuerpos

El anticuerpo IgM se aisló del suero (designado sHigM22) de un paciente con macroglobulinemia de Waldenström y se secuenció como se describe (Ciric, B. et al. (2000), Blood 97:321-323).

Clonación y Pruebas de rHigM22

Construcción de vector

1) *Fragmento de cadena ligera*

La región variables de cadena ligera (VL) se amplificó a partir de un fragmento VL clonado con TA derivado de un mRNA de anticuerpo aislado de leucocitos de sangre periférica de un paciente que fue la fuente de sHigM22. El sitio 5'-NHe, 5'-UTR y la secuencia líder artificial de una secuencia IgM humana en la base de datos de genoma humano (Tsujimoto, Y. et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12: 8407-8414) se añadieron a esta secuencia. La región constante de cadena λ (C λ) se amplificó de cADN de sangre humana con sitio adicional 3'-Avr que se encontró en C λ humano. Todas las reacciones de cadena de polimerasa (PCRs) se realizaron mediante los métodos estándares usando los siguientes cebadores diseñados para una forma identificada de la especie IgM predominante (cadena ligera designada: II) encontradas en sHigM22 (Ciric, B. et al. (2000), Blood 97:321-323);

ctagctagccgatttcggacaatcttcatgaccgctcccctctcctcctcacccttctcattcactgcagggtcctggcccagtcgtgtgacgcagccg

3'-cebador de VL: gggcagccttgggctgacctagggcgtcagc (SEQ ID NO: 1)
 5'-cebador de C λ : ctagctagctcctaggtcagcccaaggctgcccc (SEQ ID NO: 2)
 3'-cebador de C λ : atagtttagcggccgcacctatgaacattctgtagg (SEQ ID NO: 3).

2) *Fragmento de cadena pesada*

La secuencia genómica de IgM humano se aisló y clonó añadiendo dos sitios únicos en ambos extremos de VH (5': Rsr II; 3':PacI). VH se amplificó de región VH sHlgM22 clonada con TA con 5'-UTR artificial adicional y secuencia líder de la base de datos de genoma humano (11) usand los cebadores de:
5'-cebador de VH:

5 gactcggaccgcccagccactggaagtcgccggtgttccatcggtgatcatcactgaacacagaggactcacatggagtttgctgagctgggtttcctcgttgctc
tttaagaggtgtccaggtgcaggtgcagctggaggagtcgg (SEQ ID NO: 4)

3'-cebador de VH:

10 cctaattaagacctggagagccattcttactgaggagacggtagaccaggttc (SEQ ID NO: 5)

VH de IgM humano se sustituyó por fragmento de VH amplificado de sHlgM11.

15 3) *Fragmento de gen de reductasa de ácido fólico dehidroxi (dhfr)*

El fragmento dhfr se amplificó del vector pFR2000 (Simonsen, C. et al., (1983), PNAS USA 80: 2495-2499) mediante reacción PCR estándar y se ligó en PCICλ. La cadena ligera de HlgM22II combinada con dhfr se produjo mediante digestión EagI de PCICλ, y este fragmento se ligó en el sitio Eag I en el vector VH de sHlgM22 (pDM 22BII). El den del gen de este vector pDM 22BII fue 1) cadena pesada (genómica), 2) cadena ligera (cADN) y 3) dhfr. Los genes de cadena pesada y ligera se orientaron en la misma dirección pero los de dhfr fueron opuestos.

Electroporación, amplificación de Metotrexato (MTX), ELISA y purificación de IgM

25 pDM 22 BII se transfectó a 10x 10 de células F3B6 mediante electroporación; 10 g de pDM22BII linealizado por Bgl II se mezcló con 2 x 10⁷ de células F3B6, se volvió a suspender en 800 l de RPMI libre suero y enfriado con hielo sobre hielo durante 10 minutos, se pulsó una vez en 960 F/200V con el Pulsador Bio-Rad Gene (Bio-Rad, Hercules, CA), se volvió al hielo durante 30 minutos, se transfirió a un matraz de 25 cm, proporcionado con 5 ml de RPMI con 10% de suero de ternero fetal, y se incubó en 5% CO₂ a 37 °C. Después de incubación durante 48 horas,
30 el medio se sustituyo por medio fresco que contenía 0,2 μM de MTX, y la incubación continuó hasta que aparecieron colonias de supervivencia. Estas colonias se transfirieron a una placa con 24 pozos y se cultivaron en 1 M MTX. Se realizó ELISA para esos clones después de crecimiento confluyente como se describe más abajo, y los clones positivos se eligieron para posterior manipulación. Las placas TM de Nunc Maxisorp se cubrieron con 20 μg/ml de IgA+IgM+IgG (H+L) de cabra anti-humano (ICN Pharmaceuticasl, Inc., Colta Mesa, CA). Después de una etapa de bloqueo con 1% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich Col, St. Louis, MO), los sobrenadantes de sHlgM22 que expresaban células F3B6 se colocaron en placas por duplicado en diluciones 1:500, 1:1000 y 1:2000. IgM humano purificado (Organon Teknika Corp. West Chester, PA) se usó como el control estándar. Después de incubación y lavados con tampón fosfato salino (PBS/1 Tween 20, IgM monoclonal anti-humano conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich Co.) se aplicó en una dilución 1:5000 en 1% BSA. Se detectaron reacciones
40 positivas usando p-Nitrofenil Fosfato (Sigma-Aldrich Co.) y la adsorbancia se leyó en un lector de microplaca Bio-Rad a 405 nm. La concentración de MTX aumentó geométricamente comenzando en 0,2 μM y acabando en 200 μM (debería ser μM) durante un curso de 2 meses. ELISA determinó el clon más productor de anticuerpos, y se recogió el medio de cultivo de este clon. El anticuerpo IgM de sHlgM22BII recombinante se aisló de este medio mediante métodos de precipitación y diálisis PEG600 (Fluka, Buchs, Suiza) contra H₂O, seguido de fraccionación de tamaño sobre una columna Superose 6.

Evaluación de médula espinal para desmielinización/remielinización

50 Las regiones de desmielinización y remielinización de la médula espinal se visualizaron usando secciones cruzadas incrustadas en plástico tintado con 4% para-fenilenediamina. Para obtener un muestreo representativo de la completa médula ósea, se cortaron secciones transversales de 1 μm de cada tercer bloque en serie de 1 mm. Esto generó de 10 a 12 secciones transversales que representan muestras de la médula espinal cervical, torácica, lumbar y sacra. Para clasificar cda sección de médula espinal se dividió visualmente en cuatro cuadrantes, después cada cuadrante se puntuó para la presencia o ausencia de una lesión desmielinizada o remielinizada. Todas las
55 láminas se codificaron y se leyeron ciegamente. Los datos no se montaron en grupos de tratamiento hasta que se clasificaron todas las láminas. Las lesiones se juzgaron como remielinizadas cuando la lesión completa se reparó esencialmente. Las lesiones parcialmente remielinizadas se clasificaron como negativas. Los niveles de remielinización se calcularon de la siguiente manera: (el número de cuadrantes con remielinización / el número de cuadrantes totalmente desmielinizados) x 100. Los datos categóricos se evaluaron usando un análisis estadístico de chi-cuadrado.

Inmunohistoquímica

65 Se prepararon secciones de lámina cerebelar de ratón adulto SJL como se ha descrito previamente (Warrington, A. et al. (19929, J. Neurosci Res. 33:338-353). En resumen, se incrustó cerebelo fresco en 3% agarosa a temperatura de fusión baja, montado en un filtro Whatman #2, y se cortó en láminas sagitales de 300 μm. Las

láminas se transfectaron después a placas de cultivo de tejido con 48 pozos. Después de una incubación de 2 a 3 horas con 5% BSA en solución de sal equilibrada Earle™ (E/H, pH 7,4) amortiguada con N-(2-hidroxietil)piperazina-N-ácido etanosulfónico (HEPES), las láminas se etiquetaron con anticuerpos primarios en 10 µg/ml en 1% BSA en E/H, durante al menos 3 horas con balanceo suave a 4 °C. Después de lavarse con E/H, las láminas se tiñeron con anticuerpos secundarios apropiados, lavaron y después se fijaron brevemente con 4% paraformaldehído en PBS. Las láminas se montaron en MOWIOL (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) que contenía 2,5% 1,4-diazobenceno-[2.2.2]-octano (DABCO, Sigma, St. Louis, MO) y se vieron con un microscopio epifluorescente. Las células gliales primarias mezcladas y los oligodendrocitos purificados se prepararon a partir de neonatos de rata Srague-Dawley como se ha descrito previamente (Asakura, K. et al. (1997), J. Neurochem 68:2281-2290). Las células se colocaron en placas en cubreobjetos de cristal cubiertos con poli-D-lisina o poli-L-ornitina. La tinción de la superficie viva se realizó a 40 °C durante 15 minutos sobre células no fijadas después del bloqueo con E/H que contenía 3% suero de cabra normal. Los anticuerpos primarios enlazados (Abs) se detectaron con Abs secundario conjugado con fluorescencia. Las láminas se montaron y vieron como se ha descrito anteriormente.

15 Purificación de rHIgM22

Células F3B6 transfectadas con rHIgM22 crecieron en botellas rotatorias en RPMI/10% FBS/penicilina/estreptomocina/glutamina inactivado con calor complementado con 10 µM metotrexato (MTX). El medio acondicionado se concentró mediante filtración de flujo tangencial (FFT) a 0,2 mg/ml de proteína. El medio acondicionado concentrado se dializó durante la noche contra dH₂O para precipitar anticuerpos IgM. La bolita se volvió a suspender en 50 mM Tris (base Trizma), pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% p/v betaína. La bolita que se había vuelto a suspender se cagó en una columna Sephacryl S-300 (26/60) y se eluyó con 20 mM Tris, pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% betaína. El perfil de la elución consistió en ~ 2 picos principales: HMW (~80%) y LMW (~20%). Se encontró IgM pentamérico en el pico HMW. Las fracciones GF agrupadas se concentraron a ~ 0,5 mg/ml (A280) y se dializaron contra 20 mM fosfato sódico, 200 mM NaCl, pH 8,0 (tampón de concentración final).

Resultados

En este experimento, se realizaron más estudios para determinar si podía conseguirse una dosis efectiva con mayores reducciones en la concentración del anticuerpo como el único ingrediente activo o en combinación con un esteroide tal como metilprednisolona. Los resultados establecen que son posibles reducciones incluso mayores y posteriores ventajas en las dosis (Figuras 3 y 4). rHIgM22 fue efectivo en la prevención de desmielinización en una dosis de 600 µg cuando se combinó con metilprednisolona (Figura 3). Además, rHIgM22 fue significativamente efectivo en remielinización en dosis tan bajas como 500 ng (Figura 4) cuando se uso solo, y también demostró incluso mayores capacidades de remielinización administrado en una dosis de 600 µg cuando se combinó con metilprednisolona.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo IgM monoclonal humano, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada como se expone en la FIGURA 5 y SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera como se expone en la FIGURA 6 y SEQ ID NO: 9, y un transportador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de desmielinización en un humano **caracterizado en**
 10 **que** el tratamiento o prevención comprende la administración del anticuerpo en una dosis diaria en el rango de 1,25 µg/kg a 2,5 µg/kg de peso corporal.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde el tratamiento o prevención comprende la administración de la dosis diaria en una única dosis.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde el tratamiento o prevención comprende la administración de la dosis diaria en múltiples dosis divididas.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha dosis diaria se selecciona de 1,25 µg/kg, 1,3 µg/kg, 1,4 µg/kg, 1,5 µg/kg, 1,6 µg/kg, 1,7 µg/kg, 1,8 µg/kg,, 1,9 µg/kg, 2,0 µg/kg, 2,1 µg/kg, 2,2 µg/kg, 2,3, µg/kg, 2,4 µg/kg y 2,5 µg/kg de peso corporal.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, donde dicha dosis diaria corresponde a 1,25 µg/kg de peso corporal.
- 25 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, donde dicha dosis diaria corresponde a 2,0 µg/kg de peso corporal.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicha composición incluye además un esteroide, donde dicho esteroide es metilprednisolona.
- 30 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicha composición incluye además hasta 2 mg de un esteroide, comprendiendo dicho esteroide o correspondiendo a metilprednisolona.
- 35 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde dicha composición incluye de 1 a 2 mg de dicho esteroide.
- 40 10. Un anticuerpo IgM monoclonal humano, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada como se expone en la FIGURA 5 y SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera como se expone en la FIGURA 6 y SEQ ID NO: 9, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 12. Un anticuerpo IgM monoclonal humano de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho tratamiento o prevención comprende la estimulación de remielinización de axones del sistema nervioso central en un humano.
- 50 11. Un anticuerpo IgM monoclonal humano de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11 en un humano que tiene esclerosis múltiple, o un humano con una enfermedad desmielinizante, o una enfermedad u otra lesión o disfunción del sistema nervioso central.
- 55 13. Un anticuerpo IgM monoclonal humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el método de administración se selecciona de administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, subcutánea, sublingual, intramuscular, rectal, respiratoria y nasofaríngeal.
- 60
- 65

Estudio por rango de dosis de Reclym22

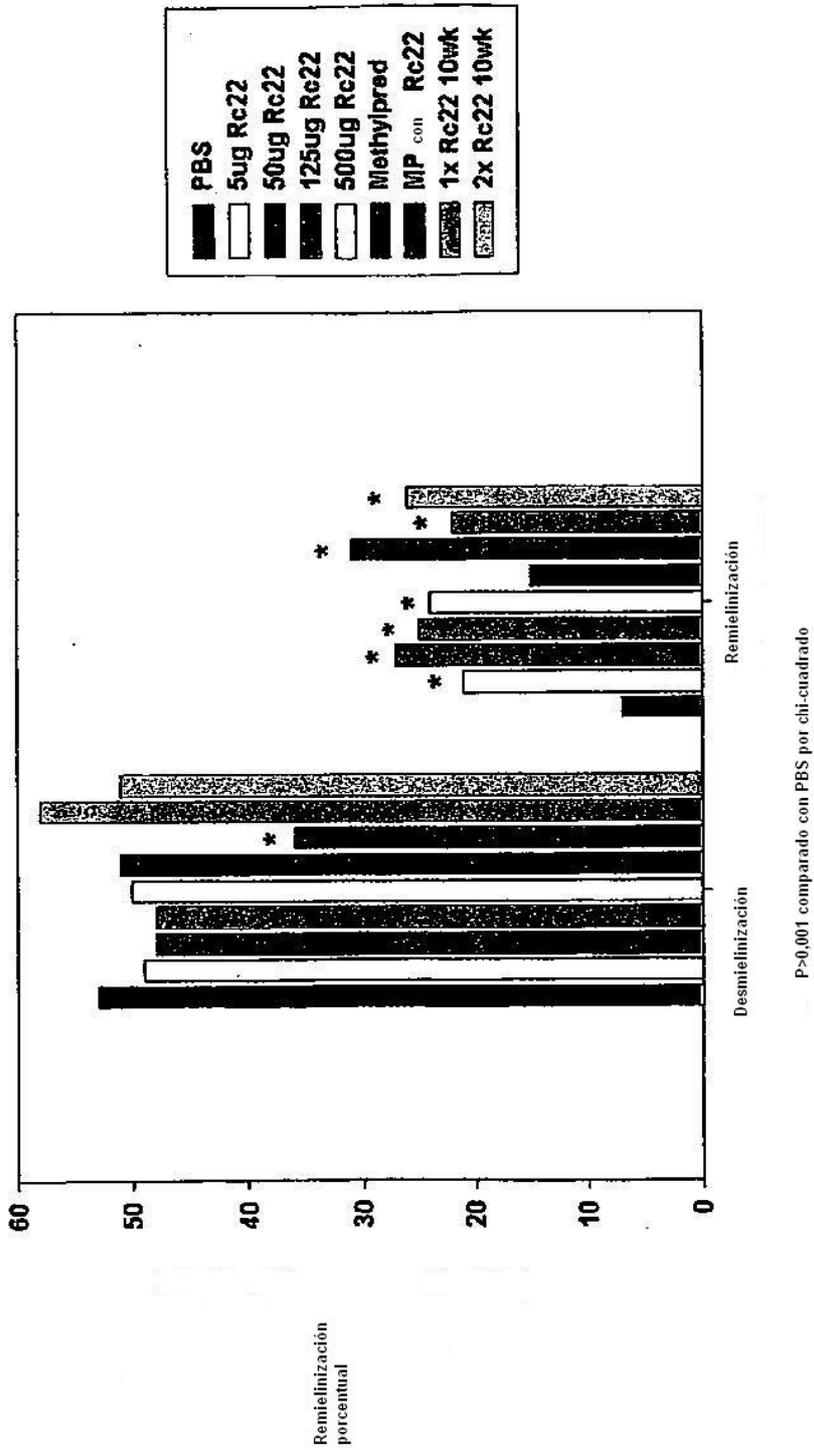


Figura 1

Efecto de la dosis en remielinización (media de individuos con error estándar)

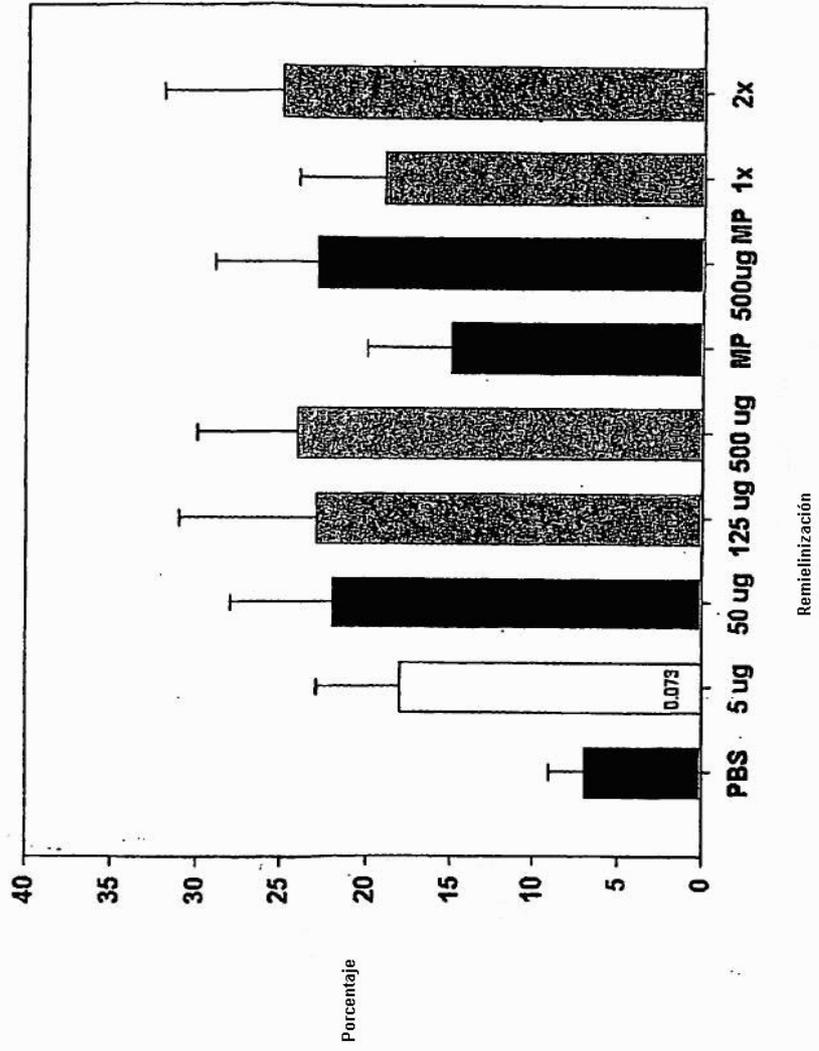
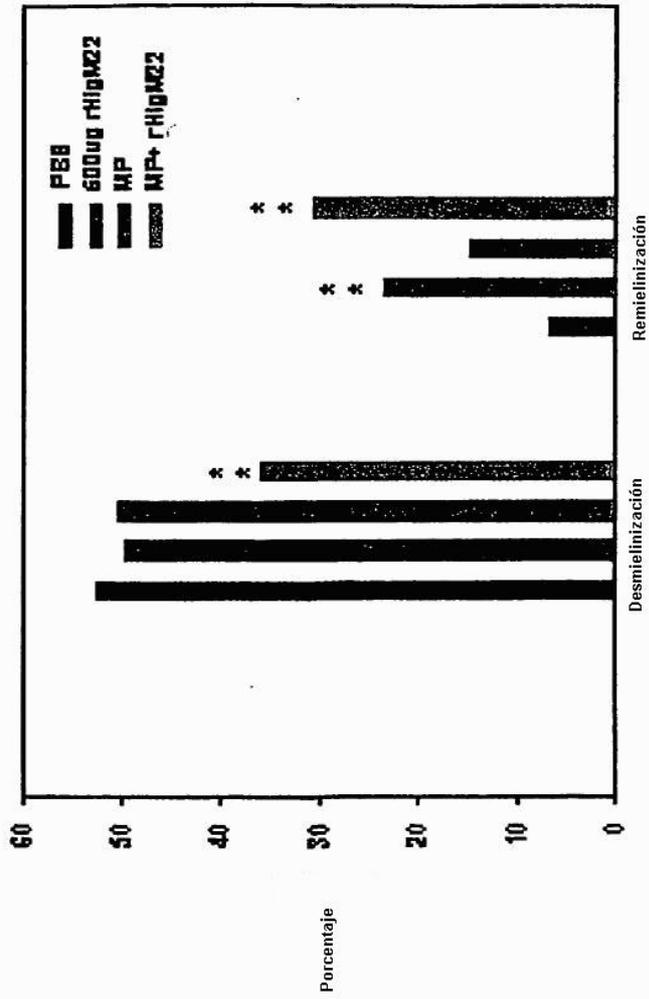


Figura 2

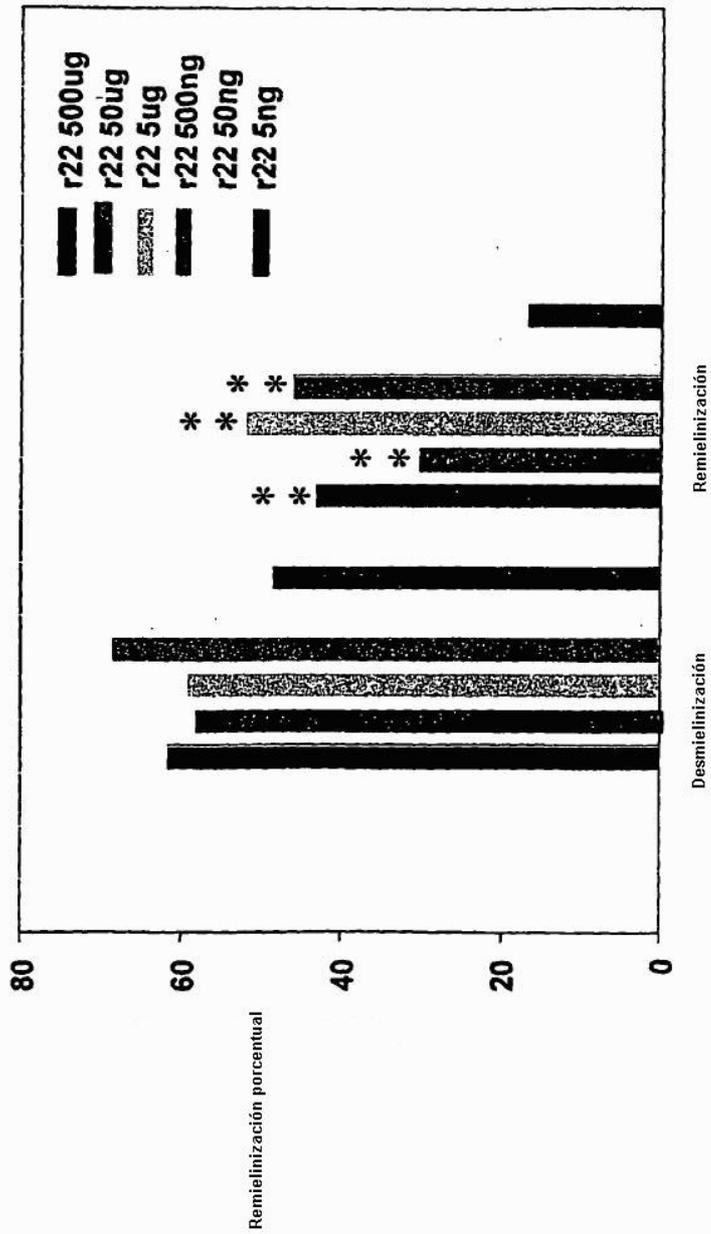
recLym22 combinado con metilprednisolona promueve remielinización y reduce carga de lesión



** $P < 0.001$ comparado a PBS byC H-square

Figura 3

Estudio por rango de dosis de rHlgM22



P>0,001 comparado con 5 ng por chi-cuadrado

Figura 4

```

/FR1-----
 1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15
 O  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG
Clon A sH-IgM.22 VH
Clon B sH-IgM.22 VH
                                     G
-----
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 R  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S
AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT

/CDR1-----/FR2-----
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
 S  S  G  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L
AGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG
  C
  C
                                     A
-----/CDR2-----
46 47 48 49 50 51 52 52A 53 54 55 56 57 58 59
 E  W  V  A  V(I) I  S  Y  D  G  S  R  K  Y  Y
GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT
  T
  A C T
                                     GG
                                     GG
-----/FR3-----
60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74
 A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC
  C
  C
-----
75 76 77 78 79 80 81 82 82A 82B 82C 83 84 85 86
 K  N  T  L  Y  L  O  M  N  S  L  T  A  D(E) D
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
  T
  T C
                                     CG
                                     C
-----/CDR3-----
87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 100A
 T  A  V  Y  Y  C  A  K  G  V  T  G  S  P  T
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AAA GAG GTG ACT GCT ATT CCC TAC
  T
                                     GA
                                     GA
                                     G G G
                                     G G G
-----/FR4-----
100B101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
 L  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  C
  C
                                     G
                                     G

```

Figura 5

```

/FR1-----
 1  2  3  4  5  6  7  8  9 11 12 13 14 15 16
O  S  V  L  T  O  P  P  S  V  S  A  A  P  G
CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT GCG GCC CCA GGA
Clon I sH-IgM.22 Vλ      G      T      T
Clon II sH-IgM.22 Vλ     G      T      T
-----/CDR1-----
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 27A 27B 28 29
O  K  V  T  I  S  C  S  G  S  S  S  N  I  G
CAG AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATT GGG
C
C
-----/FR2-----
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
N  N  F  V  S  W  Y  O  Q  L  P  G  T  A  P
AAT AAT TAT GTA TCC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACA GCC CCC
      T      A
      T      A
-----/CDR2-----/FR3-----
45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59
R(K) L  L  I  Y  D  I  T  K  R  P  S  G  I  P
AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT AAT AAG CGA CCC TCA GGG ATT CCT
G      T      C
      T      C
-----
60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74
D  R  F  S  G  S  K  S  G  T  S  A  T  L  G
GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACG TCA GCC ACC CTG GGC
-----/CDR3-----
75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89
I  T  G  L  O  T  G  D  E  A  D  Y  Y  C  G(E)
ATC ACC GGA CTC CAG ACT GGG GAC GAG GCC GAT TAT TAC TGC GGA
A
-----/FR4-----
90 91 92 93 94 95 95A 95B 96 97 98 99 100 101 102
T  W  D  S  S  L  S  A  V  V  F  G  G  G  T
ACA TGG GAT AGC AGC CTG ... ..T GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC
      AGT GC      G
      AGT GC      G
-----/Cλ-----
103 104 105 106 106A107 108 109 110
K  L  T  V  L  G  O  P  K
AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG

```

Figura 6