

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 552**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2000 E 10180618 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2287190**

54 Título: **Anticuerpos IgM humanos con la capacidad de inducir remielinización y usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos, particularmente en el sistema nervioso central**

30 Prioridad:

10.05.2000 US 568351

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

17.03.2015

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ, MOSES;
MILLER, DAVID J. y
PEASE, LARRY R.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 531 552 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).

Anticuerpos IgM humanos con la capacidad de inducir remielinización y usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos, particularmente en el sistema nervioso central

Descripción

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, al campo de la neurobiología, y, más particularmente, a la identificación de autoanticuerpos que desempeñan un papel en la función y terapia del sistema nervioso central. La invención también se refiere a materiales y procedimientos diagnósticos y terapéuticos, incluidos, a modo de ejemplo, composiciones farmacéuticas, autoanticuerpos para usar en procedimientos de tratamientos de enfermedades asociadas con la alteración neurológica, autoanticuerpos para usar en procedimientos de regeneración y restauración de la función neural, ensayos de detección selectiva y vacunas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) crónica, con frecuencia progresiva, que se caracteriza patológicamente por desmielinización primaria, normalmente sin lesión axonal inicial. La etiología y patogenia de la EM se desconocen. Varias características inmunológicas de la EM y su moderada asociación con ciertos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad ha urgido la especulación de que la EM es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario.

Una hipótesis de autoinmunidad está avalada por el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAR), en el que la inyección de ciertos componentes de mielina en animales genéticamente susceptibles conduce a la desmielinización del SNC mediada por linfocitos T. No obstante, en el SNC de los pacientes de EM no se han identificado definitivamente los autoantígenos específicos y linfocitos T reactivos a mielina patogénica ni la EM se asocia con otras enfermedades autoinmunitarias. Una hipótesis alternativa, en base a los datos epidemiológicos, es que un factor ambiental, quizá un virus no identificado, desencadena una respuesta inflamatoria en el SNC, que conduce a la destrucción directa o indirecta ("espectador") de mielina, potencialmente con un componente autoinmunitario inducido. Esta hipótesis viene avalada por las pruebas de que varias infecciones víricas naturales, tanto en seres humanos como en animales, pueden producir desmielinización. Un modelo de virus experimental de uso habitual se induce con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) (Dal Canto, M.C., y Lipton, H.L., Am. J. Path., 88:497-500 (1977)).

En Kirschning y col. (J. Neuroimmunology 99:122-130) se demostró que varios anticuerpos monoclonales (AcMo) murinos de tipo IgM que estimulan la remielinización en ratones que eran autoanticuerpos naturales codificados por genes de la línea germinal que reaccionan con los oligodendrocitos y los antígenos intracelulares. El AcMo de tipo IgM DS1F8 reactivo con oligodendrocitos humanos derivado de un paciente con esclerosis múltiple, que es similar a los AcMo murinos, está dirigido a estructuras de tipo microtúbulo. Estas similitudes del AcMo DS1F8 con los AcMo murinos que estimulan la remielinización sugieren que este AcMo humano es un autoanticuerpo natural.

Asakura y col. (Neurology 54:Suppl 3 PP A126-127) enseña que los autoanticuerpos naturales que reaccionan con los antígenos del SNC pueden estimular la remielinización.

La limitada eficacia de los tratamientos actuales para la EM y otras enfermedades desmielinizantes ha estimulado el interés en nuevas terapias para aliviar estas enfermedades. No obstante, debido a la aparentemente compleja etiopatogenia de estas enfermedades que implican potencialmente a factores ambientales y autoinmunitarios, sigue existiendo la necesidad de un tratamiento eficaz de estos trastornos desmielinizantes.

Se sabe que un grupo de autoanticuerpos exhiben actividad en el sistema nervioso central y que estaba particularmente asociado con la estimulación de la remielinización. Uno de los objetivos de los solicitantes ha sido investigar el amplio abanico de actividades de los anticuerpos y, de forma concomitante, identificar otros miembros de la clase que demuestran dichas actividades. En consecuencia, la presente invención está dirigida a la satisfacción de estos y otros objetivos.

La mención de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como admisión de que dicha referencia está disponible como "Técnica anterior" a la presente solicitud.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona:

Un anticuerpo monoclonal humano, o una mezcla, monómero o fragmento activo del mismo, caracterizado por su capacidad para unirse a oligodendrocitos, o un anticuerpo sintético derivado del mismo y que tiene la

capacidad de unirse a oligodendrocitos, con las siguientes características:

- (a) capaz de inducir la remielinización;
- (b) capaz de promover la proliferación celular de células gliales; y
- (c) capaz de promover la señalización de Ca^{2+} en oligodendrocitos; y que:

comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 17, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 18;

comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 19, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 20; o

comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 27, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 28; o

En el presente documento se han identificado y analizado anticuerpos concretos, y la invención se extiende, en consecuencia, a autoanticuerpos humanos, de modo que son ejemplos de autoanticuerpos humanos sHlgM22 (LIM 22), sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10 y CB2bG8. La invención también proporciona, en otro aspecto, un ensayo para la detección selectiva de otros anticuerpos y parejas de unión relacionadas, incluidos haptenos y análogos peptídicos, que pueden exhibir una actividad terapéutica similar. Dichas actividades incluirían el tratamiento o prevención de lesiones o disfunciones neurológicas, tal como esclerosis múltiple, ELA, ictus, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, a la promoción o estimulación de la regeneración o remielinización de los axones del sistema nervioso central en un mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a autoanticuerpos para usar en procedimientos de estimulación de la remielinización de los axones sistema nervioso central (SNC), incluidos anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de la misma, y, en particular, a autoanticuerpos humanos, o mezclas y/o fragmentos activos de los mismos, que se caracterizan por su capacidad para unirse a estructuras y células dentro del sistema nervioso central. La presente invención también se extiende a la preparación y uso de autoanticuerpos humanos, en el que son ejemplos de los autoanticuerpos humanos sHlgM22 (LYM 22), sHlgM46, ebvHlgM, MSI19D10 y CB2bG8. Las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de ejemplo se exponen en las Figuras del siguiente modo: LYM 22 se expone en las Figuras 17 y 18 (SEC ID N° 1, 5, 49 y 50); MSI19D10 se expone en las Figuras 19 y 20 (SEC ID N° 9 y 11); CB2bG8 se expone en las Figuras 27 y 28 (SEC ID N° 13 y 15); La invención se extiende a anticuerpos y a las correspondientes proteínas de anticuerpos y a moléculas pequeñas, tales como haptenos, que tienen, o corresponden al menos en parte a, las secuencias expuestas en las Figuras indicadas.

La presente invención usa un análisis de las secuencias de ADNc de la región variable de la Ig y la capacidad de unirse a estructuras y células en el sistema nervioso central, incluidos, entre otros, oligodendrocitos, de estos AcMo para determinar su utilidad en los procedimientos descritos en el presente documento. Además, este trabajo proporciona confirmación de la utilidad genérica de este grupo de autoanticuerpos como eficaces en la producción de la remielinización del sistema nervioso central

De acuerdo con una realización adicional de la invención, y como se ha indicado anteriormente, se ha definido una clase más amplia de anticuerpos y se divulga en el presente documento. Específicamente, de acuerdo con el presente documento también se divulgan y preparan autoanticuerpos monoclonales y policlonales humanos que proporcionan mayor afinidad por tejido neural y capacidad tanto diagnóstica como terapéutica. La invención se extiende más allá en cuanto a que los anticuerpos recién identificados se pueden usar para varios fines, tales como la estimulación de la remielinización, regeneración de células nerviosas dañadas, protección neuronal, sobrecrecimiento neuronal y similares.

Una característica y ventaja significativa de la presente invención reside en la fuente de anticuerpos, ya que pueden obtenerse directamente del huésped o paciente y usarse después para estimular autoterapias más seguras. Más ampliamente, el desarrollo de anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes, péptidos, moléculas pequeñas y similares, en base a estos materiales endógenos reduce, si no elimina, posibles enfermedades o disfunciones, tales como reacciones autoinmunitarias, que pueden ser el resultado de la introducción in vivo y uso de materiales exógenos. Asimismo, el origen endógeno de los anticuerpos ofrece una ventaja adicional en cuanto a que es posible estudiar el proceso de reparación en el paciente o huésped e identificar, potencialmente, un mecanismo de acción subyacente en el tratamiento de la afección, que en sí misma puede proporcionar puntos de vista y estrategias terapéuticas adicionales.

Además, se contempla que la identificación de la relación entre agentes que estimulan la señalización del calcio, como mediante la inducción de picos de Ca^{++} , en los oligodendrocitos, y el inicio y/o estimulación de las actividades terapéuticas indicadas, proporciona un procedimiento de identificar agentes terapéuticos mediante la demostración de la señalización del calcio en, por ejemplo, oligodendrocitos. En consecuencia, la invención también

se extiende a este uso y actividad.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para seleccionar bibliotecas peptídicas o haptenos, de modo que los péptidos reactivos o los haptenos se pueden aislar y analizar su capacidad para remielinizar, inducir proliferación celular, diferenciación, sobrecrecimiento neural, brotes de neuritas y/o señalización de Ca^{++} . Una vez aislados y purificados, dichos péptidos pueden usarse después para seleccionar otros anticuerpos policlonales o monoclonales, otras moléculas que pueden inducir remielinización, proliferación o diferenciación celular, sobrecrecimiento neuronal, brotes de neuritas y/o señalización de Ca^{++} , el último mencionado, se cita en el presente documento que es relevante a la proliferación y a la correspondiente actividad de las células gliales. Particularmente, los péptidos, haptenos y otras moléculas que corresponden a los anticuerpos de la invención se pueden identificar por su capacidad para unirse a los oligodendrocitos y, de este modo, inducir rehabilitación neural, tal como remielinización, regeneración y neuroprotección.

Asimismo, en el presente documento se describen péptidos que se unen a los autoanticuerpos descritos en el presente documento, de modo que estos péptidos, en virtud de su secuencia, estructura tridimensional o cambios conformacionales que surgen de la unión del anticuerpo, pueden usarse en y o por sí mismos como vacunas peptídicas. Estos péptidos pueden tener propiedades neuromoduladoras y/o inmunomoduladoras, y pueden proporcionar un procedimiento de inducción de una respuesta proliferativa de células neurales y/o un papel neuroprotector, neuroregenerativo y/o remielinizante en mamíferos que necesiten dicha terapia.

Asimismo, en el presente documento se describen haptenos que se pueden unir a los péptidos, los anticuerpos y/u otros sustratos relevantes que pueden poseer inmunogenicidad, de modo que también pueden funcionar como componentes activos en formulaciones terapéuticas, que incluyen también vacunas. Como se describe en el presente documento, se pueden combinar uno o más haptenos con otros péptidos de la presente invención, en una formulación de vacuna.

Estos péptidos se pueden formular como composiciones farmacéuticas con estabilizantes para evitar la degradación proteolítica, de modo que se amplía su semivida para su administración por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intratecal o como preparaciones de liposomas a mamíferos que necesiten dicha terapia.

La presente invención también se refiere a autoanticuerpos para usar en procedimientos de tratamiento de enfermedades desmielinizantes en mamíferos, tales como esclerosis múltiple en seres humanos, y enfermedades virales del sistema nervioso central de seres humanos y animales domésticos, tales como encefalomiелitis postinfecciosa, o inhibir profilácticamente la iniciación o progresión de la desmielinización en estos estados patológicos, usando los anticuerpos monoclonales, o fragmentos activos de los mismos, de la presente invención. La presente invención se refiere además a procedimientos in vitro de producción y estimulación de la proliferación de células gliales, tales como oligodendrocitos, y al uso de estas células gliales para tratar enfermedades desmielinizantes.

En un aspecto adicional, la invención se extiende a un grupo de moléculas que se denominarán en el presente documento agentes neuromoduladores y que son notables en su actividad terapéutica en el SNC. En consecuencia, la invención se refiere a agentes neuromoduladores con eficacia concreta en el SNC, en el que los agentes comprenden un material seleccionado del grupo consistente en un anticuerpo de la presente invención, incluidos anticuerpos del subtipo IgM, monómeros de los mismos, un análogo peptídico, un hapteno, fragmentos activos de los mismos, agonistas de los mismos, miméticos de los mismos y combinaciones de los mismos. Los agentes neuromoduladores tienen las características siguientes: inducen remielinización y/o proliferación celular de células gliales; y/o evocan la señalización de Ca^{++} con oligodendrocitos.

Más particularmente, los anticuerpos comprendidos dentro del alcance de los agentes neuromoduladores de la invención se pueden seleccionar del grupo consistente en AcMo sHlgM22 (LYM 22), sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10, CB2bG8 mezclas de los mismos, monómeros de los mismos, fragmentos activos de los mismos y autoanticuerpos naturales o sintéticos que tienen las características de los AcMo sHlgM22 (LYM 22), sHlgM46, y ebvHlgM MSI19D10, CB2bG8, particularmente anticuerpos humanos. Los presentes agentes neuromoduladores pueden derivar de células de mamífero y, específicamente, pueden derivar de células humanas. Además, los agentes neuromoduladores pueden comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la FIGURA 17 (SEC ID N° 1 y 49), FIGURA 18 (SEC ID N° 5 y 50), FIGURA 19 (SEC ID N° 9, FIGURA 20 (SEC ID N° 11), FIGURA 27 (SEC ID N° 13), FIGURA 28 (SEC ID N° 15), o fragmentos activos de los mismos.

La presente invención también se refiere a una molécula de ADN recombinante o gen clonado, o a una variante degenerada del mismo, que codifica una clase de moléculas que, en el presente documento, también se denominarán agentes neuromoduladores y que incluyen y se pueden seleccionar de los anticuerpos de la invención, y, particularmente, de los anticuerpos que tienen secuencias correspondientes, al menos en parte, a las secuencias presentadas en las FIGURAS 17-20, 27, 28 y 37-43, y péptidos que pueden corresponder al menos en parte a los anticuerpos de la presente invención, que también se denominarán en el presente documento péptidos

de anticuerpo y, por ejemplo, péptidos que tienen una o más secuencias correspondientes, al menos en parte, a las FIGURAS 17-20, 27, 28 y 37-43, y moléculas pequeñas, tales como haptenos; incluidas moléculas de ADN recombinante o genes clonados que tienen las mismas secuencias o secuencias complementarias.

Más particularmente, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN o variante degenerada de la misma, que codifica un anticuerpo, un análogo peptídico del mismo, un hapteno correspondiente o un fragmento activo del mismo y que se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- (A) la secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 17 (SEC ID N° 1, 49);
- (B) la secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 18 (SEC ID N° 5, 50);
- (C) La secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 19 (SEC ID N° 9);
- (D) la secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 20 (SEC ID N° 11);
- (E) la secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 27 (SEC ID N° 13);
- (F) la secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia correspondiente a al menos una porción de la FIGURA 28 (SEC ID N° 15);
- (G) secuencias de ADN que hibridan con cualquiera de las secuencias de ADN anteriores en condiciones de hibridación estándar; y
- (H) secuencias de ADN que codifican la expresión de una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ADN anteriores.

La presente invención también incluye proteínas derivadas de, o correspondientes a, dichos anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, que tienen las actividades indicadas en el presente documento y que muestra las secuencias de aminoácidos indicadas y descritas con anterioridad y seleccionadas de las FIGURAS 17-20, 27 y 28. Asimismo, la presente invención se extiende a haptenos que demuestran las mismas actividades que las proteínas o péptidos de anticuerpo, y que se pueden administrar para fines terapéuticos de un modo similar, como mediante formulación en una composición terapéutica o vacuna. En una realización, se puede preparar una composición terapéutica o vacuna que incluye tanto péptidos como haptenos.

En una realización adicional de la invención, la secuencia completa de ADN de la molécula de ADN recombinante o gen clonado determinado de este modo puede estar unido operativamente a una secuencia de control de la expresión que se puede introducir en un huésped adecuado. De acuerdo con esto, la invención se extiende 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 una realización concreta, la secuencia de ADN de la región variable de un anticuerpo de la presente invención se puede usar para generar anticuerpo(s) sintético(s). En particular, la secuencia de la región variable se puede combinar con su secuencia de la región constante proporcionada genéticamente, para proporcionar un anticuerpo sintético. La presente invención proporciona vectores para generar anticuerpos sintéticos derivados de, y que comprende, las secuencias de ADN, en particular secuencias de la región variable, de los anticuerpos de la presente invención.

De acuerdo con otras características preferidas de ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión recombinante para producir péptidos de anticuerpo biológicamente activos animales o, particularmente, humanos.

La presente invención incluye varios modos para la preparación de clones de los autoanticuerpos, péptidos, haptenos correspondientes u otros análogos de molécula pequeña de los mismos, incluidos, como se ilustra en el presente documento, técnicas recombinantes conocidas, y la invención, en consecuencia, pretende abarcar dichas preparaciones sintéticas en su alcance. El aislamiento del ADNc y las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento facilitan la reproducción de los presentes anticuerpos o sus análogos mediante dichas técnicas recombinantes y, de acuerdo con esto, la invención se extiende a los vectores de expresión preparados a partir de las secuencias de ADN divulgadas para la expresión en sistemas del huésped mediante técnicas de ADN recombinante y a los huéspedes transformados resultantes.

La invención incluye un sistema de ensayo para detección selectiva de potenciales fármacos eficaces para modular la actividad neurológica de las células neurales de mamífero diana potenciando la actividad de los presentes autoanticuerpos o sus análogos. En un caso, el fármaco de ensayo se pudo administrar 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 sobre la actividad de unión de los autoanticuerpos a cualquier muestra química (incluido ADN), o al fármaco de ensayo, mediante comparación con un control.

El sistema de ensayo podría adaptarse para identificar fármacos u otras entidades capaces de unirse a los autoanticuerpos y/o sus dianas, incluidos péptidos, haptenos, otros factores o proteínas, se encuentren en el citoplasma, el núcleo o en cualquier otro lugar, de modo que potencian la actividad de anticuerpo, incluido, por ejemplo, la respuesta inmunitaria, el crecimiento neural, la neuroprotección y la remielinización, y las correspondientes actividades terapéuticas indicadas en el presente documento. Dicho ensayo sería útil en la identificación de candidatos a fármaco de entre bibliotecas peptídicas y otras de moléculas pequeñas, sueros y otros fluidos corporales relevantes, y en el desarrollo de fármacos que serían específicos bien en la estimulación o bien en la inhibición de una actividad celular concreta, o que potenciarían dicha actividad, en tiempo o en nivel de actividad. Por ejemplo, dichos fármacos podrían usarse para estimular la remielinización o para tratar otras enfermedades o lesiones, como, por ejemplo, al hacer las neuronas del SNC capaces o con mejor capacidad para adaptarse en el recrecimiento o regeneración.

Asimismo, la presente invención se extiende al desarrollo de anticuerpos correspondientes a los agentes neuromoduladores de la invención, incluidos los anticuerpos naturales y preparados de forma recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos podrían usarse para la detección selectiva en bibliotecas de expresión para obtener el gen o genes que codifican los péptidos que pueden funcionar como agentes neuromoduladores y que podrían funcionar en, por ejemplo, una vacuna. Dichos anticuerpos podrían incluir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales preparados mediante técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos (quiméricos) y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que las hacen adecuadas para uso diagnóstico adicional junto con su capacidad para emular o modular la actividad de los autoanticuerpos humanos que son parte de los agentes neuromoduladores de la presente invención.

Por tanto, los agentes neuromoduladores, sus análogos y/o análogos, y cualquier antagonista o anticuerpo que se puede producir frente a ellos, se pueden usar en relación con varias técnicas diagnósticas, incluidos inmunoensayos, tales como radioinmunoensayo, usando, por ejemplo, un anticuerpo frente a los agentes neuromoduladores que se ha marcado con adición radioactiva o radioyodinación.

En un inmunoensayo se puede preparar una cantidad control de los antagonistas o anticuerpos de los mismos, o similares, y marcar con una enzima, una pareja de unión específica y/o un elemento radioactivo, y después se puede introducir en una muestra celular. Después de que el material marcado, o su(s) pareja(s) de unión ha tenido la oportunidad de reaccionar con sitios dentro de la muestra, la masa resultante se puede analizar mediante técnicas conocidas, que pueden variar con la naturaleza del marcador unido.

En el caso en el que se use un marcador radioactivo, como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re , se pueden usar procedimientos de recuento conocidos disponibles en la actualidad. En el caso en el que el marcador es una enzima, la detección se puede conseguir mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas usadas en la actualidad conocidas en la materia.

La presente invención incluye un sistema de ensayo que se puede preparar en forma de un kit de ensayo para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia de los agentes neuromoduladores o para identificar fármacos u otros agentes que pueden imitar o bloquear su actividad. El sistema o kit de ensayo puede comprender un componente marcado preparado mediante una de las técnicas radioactivas y/o enzimáticas tratadas en el presente documento, acoplar un marcador a los agentes neuromoduladores, sus agonistas y/o antagonistas y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales, al menos uno de los cuales es un ligando libre o inmovilizado, capaces de unirse al componente marcado, a su pareja de unión, a uno de los componentes que se va a determinar o a su(s) pareja(s) de unión.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a autoanticuerpos para usar en ciertos procedimientos terapéuticos que se basarían en la actividad de los 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 que se haya determinado que poseen la misma actividad. Un primer procedimientos terapéutico se asocia con la prevención de las manifestaciones de afecciones relacionadas causalmente o después de la actividad de unión de los anticuerpos o sus subunidades, y comprende administrar un agente capaz de estimular la producción y/o actividad de los agentes neuromoduladores, los correspondientes autoanticuerpos, péptidos de anticuerpos, fragmentos activos o subunidades de los mismos, bien individualmente o mezclados entre sí en una cantidad eficaz para prevenir o tratar el desarrollo de dichas afecciones en el huésped. Por ejemplo, se pueden administrar fármacos u otras parejas de unión a los anticuerpos o sus fragmentos, o similares, para potenciar la actividad neuroregeneradora y/o neuroprotectora, o para estimular la remielinización como en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Más específicamente, el procedimiento terapéutico al que en general se hace referencia en el presente documento podría incluir el procedimiento para el tratamiento de varias enfermedades u otras disfunciones y desorganizaciones celulares, mediante la administración de composiciones farmacéuticas que pueden comprender

inhibidores o potenciadores eficaces de la activación de los agentes neuromoduladores u otros fármacos igualmente eficaces, por ejemplo, mediante un ensayo de detección selectiva de fármacos preparado y usado de acuerdo con un aspecto de la presente invención tratado anteriormente. Por ejemplo, fármacos u otras parejas de unión a los agentes neuromoduladores o proteínas similares, que tienen secuencias correspondientes, al menos en parte, a las secuencias representadas por la FIGURA 17 (SEC ID N° 1, 49), FIGURA 18 (SEC ID N° 5, 50), FIGURA 19 (SEC ID N° 9), FIGURA 20 (SEC ID N° 11), FIGURA 27 (SEC ID N° 13), FIGURA 28 (SEC ID N° 15) se pueden administrar para inhibir o potenciar la neuroregeneración, neuroprotección o remielinización, como en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple. En particular, la proteína de sHlgM46, (LYM 22), cuyas secuencias se presentan en las FIGURAS 17 y 18, y/o las de MSI19D10 presentadas en las FIGURAS 19 y 20, y/o las de CB2bG8 presentadas en las FIGURAS 27 y 28, sus anticuerpos, agonistas, antagonistas o fragmentos activos de los mismos, se podrían preparar en formulaciones farmacéuticas, incluidas vacunas, para administrar en los casos en los que la terapia neuroregeneradora y/o neuroprotectora o desmielinización es adecuada, tal como para tratar la enfermedad de Alzheimer, ELA, EM, enfermedad de Parkinson o lesiones en la médula espinal. La presente invención incluye combinaciones o mezclas de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, en el que más de uno de los anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos, más particularmente seleccionados del grupo de sHlgM22, sHlgM46, MSI19E10 y CB2bG8, se pueden preparar en composiciones o formulaciones farmacéuticas y terapéuticas. Además, la invención proporciona combinaciones adicionales del(los) anticuerpo(s) como compuestos terapéuticos, fármacos o agentes útiles en dicha terapia neuroregeneradora y/o neuroprotectora o de remielinización. Por ejemplo, la formulación o composición de anticuerpo de la presente invención se puede combinar con compuestos terapéuticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple, incluidos, entre otros, formulaciones con interferón beta ((Betaseron, etc.) y copolímero 1 (Copaxone).

De acuerdo con esto, es un objeto principal de la presente invención proporcionar agentes neuromoduladores, incluidos autoanticuerpos humanos y los correspondientes péptidos de anticuerpo, haptenos, análogos y fragmentos activos de los mismos en forma purificada, que exhibe ciertas características y actividades asociadas con la estimulación de la actividad neuroregeneradora y/o neuroprotectora.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar la presencia, la cantidad y la actividad de los autoanticuerpos en mamíferos en los que se sospecha que ha estados patológicos invasivos, espontáneos o idiopáticos.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento y un sistema de ensayo asociado para la detección selectiva de sustancias, tales como fármacos, agentes y similares, potencialmente eficaces en la simulación de la actividad o para combatir cualquier efecto adverso de los autoanticuerpos y/o sus fragmentos, subunidades o similares, en mamíferos.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos para tratar enfermedades desmielinizantes en mamíferos, tales como esclerosis múltiple en seres humanos, y enfermedades virales del sistema nervioso central de seres humanos y animales domésticos, tales como encefalomiелitis postinfecciosa, o inhibir profilácticamente la iniciación o progresión de la desmielinización en estos estados patológicos, usando los autoanticuerpos monoclonales descritos, fragmentos activos de los mismos, u otros autoanticuerpos naturales o sintéticos que tienen las características de los anticuerpos humanos de ejemplo mediante sHlgM22 (LIM 22), sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10 y CB2bG8. Además, se proporcionan dichos procedimientos que usan los autoanticuerpos, fragmentos activos de los mismos, u otros autoanticuerpos naturales o sintéticos que tienen las características de los anticuerpos humanos de ejemplo mediante AKJR4, CB2iE12, CB2iE7 y MSI19E5.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos in vitro de producción y estimulación de la proliferación de células gliales, tales como oligodendrocitos, y al uso de estas células gliales para tratar enfermedades desmielinizantes.

Es todavía un objeto adicional de la presente invención proporcionar los presentes agentes neuromoduladores, y composiciones farmacéuticas, que incluyen vacunas que comprenden las mismas, para uso en procedimientos terapéuticos que comprenden, o se basan en, los presentes agentes neuromoduladores, y, particularmente, los autoanticuerpos humanos, fragmentos, incluidos fragmentos peptídicos, haptenos, subunidades, agonistas, pareja(s) de unión, o en agentes o fármacos que controlan la producción o que imitan o antagonizan las actividades de los agentes neuromoduladores.

Es todavía un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos de ensayo que incluyen ensayos de selección, para la identificación de fármacos y otras moléculas que imitan o antagonizan los agentes neuromoduladores de la invención y que, en consecuencia, se pueden considerar para uso como agentes terapéuticos.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica desde una revisión de la descripción siguiente, que procede en referencia a las siguientes figuras ilustrativas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 comprende fotografías que muestran que los anticuerpos policlonales humanos y los anticuerpos IgM monoclonales humanos derivados de suero (sHlgMs) se unen con una especificidad alta a los antígenos de superficie sobre las células en láminas de cerebelo. Marcaje inmunofluorescencia indirecta de láminas sin fijar de cerebelo de rata posnatal. Los sHlgM muestran una variedad de especificidades por poblaciones y estructuras celulares dentro de una lámina de cerebro sin fijar. Esta propiedad se usó como uno de los criterios para seleccionar anticuerpos candidatos para analizar in vivo la capacidad para estimular la remielinización (véase la Tabla 1 y la Figura 12). La IgG policlonal humana se une muy débilmente a muchas estructuras dentro del cerebelo, incluida la sustancia blanca y las células de Purkinje (A), mientras que la IgM humana policlonal se une fuertemente a la mielina y los oligodendrocitos dentro de la sustancia blanca central de las hojas, los cuerpos de las células de Purkinje y muchas células pequeñas dentro de la capa granular y molecular (B). sHlgM 22 (C) se une bien al citoesqueleto de los astrocitos dañados sobre la sustancia blanca central de las hojas, células de Purkinje y sus arborizaciones dendríticas y a células redondas pequeñas en la capa molecular. sHlgM 22 marca débilmente, pero uniformemente, marca la superficie de las células granulares. sHlgM 14 (D) se une bien a las células de la capa granular y las células de Purkinje localizadas en la superficie de la lámina, mientras que la sustancia blanca central de las hojas está considerablemente desprovista de marcador. sHlgM 1 (E) marca el citoesqueleto de los astrocitos sobre la sustancia blanca central de las hojas. Las demás estructuras se identifican justo por encima de los niveles de fondo. sHlgM2 (F) se une a las células de la capa granular y a las fibras que atraviesan la sustancia blanca central de las hojas. Aumento x.

La FIGURA 2 comprende fotografías que muestran que sHlgMs adicionales se unen con una especificidad elevada a las células en las láminas del cerebelo. Marcaje de inmunofluorescencia indirecta de láminas sin fijar de cerebelo de rata posnatal. Los sHlgM muestran una variedad de especificidades por poblaciones y estructuras celulares dentro de una lámina de cerebro sin fijar. sHlgM 12 (A) se une y da un aspecto esponjoso a la sustancia blanca central de las hojas y un marcaje uniforme sobre la capa molecular, reminiscente de una molécula de la matriz extracelular. Los astrocitos que se encuentran encima también están bien definidos. sHlgM 29 (B) se une muy débilmente a muchas estructuras dentro del cerebelo, con una intensidad justo por encima de la de fondo, a excepción de una población pequeña de neuronas en las capas granular y molecular. Las extensiones axónicas sobre 100 (m de longitud están claramente delineadas. sHlgM 31 (C) y sHlgM 50 (F), cada uno, se unen predominantemente a la capa granular, con poca unión a la sustancia blanca, células de Purkinje o astrocitos. El patrón de unión de sHlgM 50 es también reminiscente de una molécula de matriz extracelular. sHlgM 42 (D) se une en un patrón fibroso a toda la hoja, las capas molecular y granular y a la sustancia blanca. sHlgM 46 (E) se une en un patrón fibroso a la capa granular y a la sustancia blanca. Los cuerpos de las células de Purkinje están bien definidos.

La FIGURA 3 comprende fotografías que muestran que sHlgM se unen con una especificidad elevada a las láminas sin fijar de sustancia blanca cortical humana de adulto. Marcaje de inmunofluorescencia indirecta de láminas sin fijar de sustancia blanca cortical humana de adulto. La sustancia blanca cortical humana se obtuvo en autopsia de un individuo sin infección ni traumatismo del SNC, La causa de la muerte fue otra no relacionada con el SNC. El tejido se mantuvo eh hielo y se mantuvo frío durante todo el procedimiento de marcaje con anticuerpo. sHlgM 2 (A) se une sólo a unas pocas células dentro del campo de visión. En contraste, otras sHlgM se unen a la sustancia blanca humana bastante bien y con un grado alto de especificada. sHlgM 32 se une a las células de aspecto de astrocito de tipo 2 (C), mientras que sHlgM 31 se une a muchos cuerpos celulares redondos no identificados (B). sHlgM 26 se une a células de aspecto de oligodendrocitos y a sustancia blanca fibrosa (E). sHlgM 22 se une a la sustancia blanca cortical humana de un modo que sugiere una molécula unida a matriz extracelular (D). Aumento x.

La FIGURA 4 comprende fotografías que muestran que los anticuerpos IgM monoclonales derivados del clon de células B humanas immortalizadas con EBV (ebvHlgM) se unen con una especificidad alta a los antígenos de superficie sobre las células en el cerebelo. Marcaje de inmunofluorescencia indirecta de láminas sin fijar de cerebelo de rata posnatal. Los ebvHlgM muestran una variedad de especificidades por poblaciones y estructuras celulares dentro de una lámina de cerebro de rata sin fijar. ebvHlgM MSI19E15 (A) se une a estructuras fibrosas dentro de la sustancia blanca y a las capas granular y molecular en un patrón de casi confluencia. ebvHlgM AKJJR4 (B) se une casi exclusivamente a la capa granular. Las células pequeñas dentro de la capa molecular también se identifican. ebvHlgMs MSI17A2 (C) y MSI20H10 (E) se unen a la sustancia blanca central las capas granular y molecular y las células de Purkinje con varios grados de intensidad. ebvHlgM MSI16E6 (D) demuestra una afinidad muy fuerte por las células de Purkinje y sus árboles dendríticos, mientras que la capa granular está marcada mucho menos claramente. ebvHlgM MSI7E11 (F) se une de un modo puntual a sólo unas pocas células de aspecto glial en la superficie de la lámina cerebral. Aumento x.

La FIGURA 5 muestra que ebvHlgM adicionales que se unen con una especificidad elevada a los antígenos de superficie sobre las células en las láminas del cerebelo. Marcaje inmunofluorescencia indirecta de láminas

sin fijar de cerebelo de rata posnatal. Los ebvHlgM muestran una variedad de especificidades por poblaciones y estructuras celulares dentro de una lámina de cerebro sin fijar. Cada panel muestra el extremo terminal de una única hoja cerebelar, incluida la sustancia blanca central, y las capas granular, de Purkinje y molecular. Los sobrenadantes que contienen ebvHlgM se incubaron a 1:1 con medio tamponado sobre láminas de cerebro. Muchos ebvHlgM se unen a la sustancia blanca, los cuerpos de las células de Purkinje y a células pequeñas dentro de la capa molecular, pero con afinidades variables. ebvHlgM MSI19D10 (A) se une fuertemente a las células de la capa granular y a las células de Purkinje y a sus árboles dendríticos, además de identificar débilmente la sustancia blanca y los astrocitos. ebvHlgM MSI19D10 se analizó según su capacidad para estimular la remielinización in vivo (véase la Tabla 1 y la Fig. 13). Se han aislado otros ebvHlgMs, CB2bG8 (B), CB2eC2 (C), CB2iE12 (D), y MSI10E10 (F) de unión en el cerebro y se requieren estudios adicionales, pero no se han analizado in vivo. CB2eC2 (E) es la intensidad típica de un sobrenadante no reactivo. Aumento x.

La FIGURA 6 muestra que la IgM humana policlonal se une a los oligodendrocitos en cultivo. Mediante inmunohistoquímica, la IgM humana policlonal tiñe la superficie de una subpoblación de oligodendrocitos. No se observó reactividad a los antígenos de superficie de los oligodendrocitos con IgG humana policlonal u sueros de sHlgM 1 o sHlgM 2. Inmunocitoquímica con IgM o IgG humana combinada en células fijadas y permeabilizadas mostró una tinción mínima de las estructuras intracelulares.

La FIGURA 7 muestra que sHlgM se unen con una especificidad elevada a los antígenos de superficie sobre las células gliales en cultivo. Marcaje de inmunofluorescencia indirecta de cultivos de células gliales mixtas primarias de ratas vivas a los nueve días del sembrado. sHlgM demuestran varias especificidades respecto a los tipos celulares unidos, así como la etapa de diferenciación celular identificada en los cultivos de células gliales. sHlgM 12 se une a grupos de posibles progenitores de oligodendrocitos (A, marcador verde) en la niebla de los oligodendrocitos OD4 + más maduros (A, marcador rojo). sHlgM 22 se une a los oligodendrocitos en las etapas maduras (B) adherentes a la superficie del cultivo glial. sHlgM 46 se une fuertemente a las etapas maduras de los oligodendrocitos (C, centro de la figura) y a las etapas inmaduras de los oligodendrocitos con un marcador punteado más débil (C, izquierda de la figura). sHlgM 42 (D) y sHlgM 51 (F) se unen ambas a las etapas maduras de los oligodendrocitos y débilmente, a los astrocitos subyacentes. sHlgM 30 se une a los cuerpos celulares de la mayoría de las células en cultivo, mientras que no se delinean extensiones del proceso (E). Aumento x.

La FIGURA 8 muestra que las sHlgM se unen a las células del linaje de los oligodendrocitos en láminas de cerebelo y cultivos de células gliales primarias mixtas. Las células identificadas por los sHlgM se marcan de forma conjunta con marcadores para el linaje de los oligodendrocitos. Las células que se unen a sHlgM 22 en una lámina sin fijar de cerebelo de rata neonata co- marcan el anticuerpo Rip, un marcador citoplasmático para etapas maduras de los oligodendrocitos. Las imágenes confocales de doble marcador demuestran que las células positivas para sHlgM 22 (A) también son positivas para Rip (C). Las imágenes (A) y (C) se fusionan en (E). Las células que se unen a sHlgM 51 en cultivos de células gliales de rata primarias mixtas (B) también son positivas 04 (D). 04, una anti-sulfatida, es un marcador bien establecido para el linaje de oligodendrocitos que aparece antes del cese de la proliferación y se mantiene en la vaina de mielina adulta. Las imágenes (B) y (D) se fusionan en (F). Aumento x.

La FIGURA 9 muestra que las sHlgM se unen a las células del linaje de los oligodendrocitos en láminas de cerebelo y cultivos de células gliales primarias mixtas. Las células identificadas por ebvHlgM MSI19E5 en una lámina sin fijar de cerebelo de rata neonata co-marcan el anticuerpo 04, una anti-sulfatida y marcador de superficie celular para oligodendrocitos. Las imágenes confocales de doble marcador de células dentro de la sustancia blanca de las hojas demuestran que las células positivas demuestran células positivas para ebvHlgM MSI19E5 (A) que también son positivas para 04 (B). Las imágenes (A) y (B) se fusionan en (C).

La FIGURA 10 presenta los resultados de la detección selectiva de sHlgM según la unión a los antígenos del SNC encontrados en el homogeneizado de médula espinal. Los sHlgMs se sometieron a detección selectiva por su unión al homogeneizado de médula espinal unido a placas de poliestireno. La mayoría de los antígenos que se unen a la placa son lípidos y proteínas de la sustancia blanca de la médula espinal. Por tanto, la unión fuerte al homogeneizado de SCH se puede interpretar como unión a los componentes de la sustancia blanca. Sólo 1 sHlgM se une al SCH con una DO superior a 1, sHlgM 22. Este anticuerpo también se une bien a láminas cerebrales, los oligodendrocitos en cultivo, y se ha analizado la capacidad de estimular la remielinización in vivo (véase la Tabla 1). Se ha demostrado que este sencillo ensayo es una potente herramienta en la predicción de la capacidad de un anticuerpo para estimular la remielinización in vivo. Otros sHlgM que se unen bien a SCH (tal como 38 y 49) se están estudiando.

La FIGURA 11 muestra los resultados de la detección selectiva de ebvHlgM según la unión a los antígenos del SNC encontrados en el homogeneizado de médula espinal. Los ebvHlgM se sometieron a detección selectiva por su unión al homogeneizado de médula espinal unido a placas de poliestireno. Cuatro ebvHlgM se unieron al homogeneizado de SCH con una DO superior a 1. Uno de estos, MSI19D10 se ha analizado

según su capacidad para estimular la remielinización in vivo. (véase la Tabla 1). También se ha analizado in vivo un anticuerpo de unión baja, AKJR4 (véase la Tabla 1). Otro anticuerpo de unión fuerte, AKJR8, se está estudiando. Los clones CB2iH1 y CB1bD2, producen muy poco anticuerpo en cultivo. De nuevo, se ha demostrado que este sencillo ensayo es una potente herramienta para la detección selectiva de anticuerpos y en la predicción de la capacidad de un anticuerpo para estimular la remielinización in vivo.

La FIGURA 12 demuestra que los anticuerpos policlonales humanos y un sHlgM estimulan la remielinización en ratones infectados con TMEV. Fotomicrografías ópticas de regiones de patología de la mielina en médulas espinales de ratones SJL/J infectados crónicamente con TMEV. Se observa extensa remielinización del SNC, caracterizada por vainas de mielina finas en relación con el diámetro del axon, en ratones tras el tratamiento con IgG (A) policlonal humana, IgM (B) policlonal humana y sHlgM 22 (C). Se observó desmielinización sin remielinización significativa en ratones tratados con sHlgM 14 (D), sHlgM 1(E) y sHlgM 2. Secciones embebidas en radita se tiñeron con 1 % de p-fenilendiamina. Aumento x. Se ha demostrado que la IgM policlonal humana es superior en la capacidad de estimular la remielinización in vivo a la IgG policlonal humana (Tabla 1). Parece que la especificidad fuerte del SNC es uno de los requisitos para que un anticuerpo estimule la remielinización in vivo, pero sola no es suficiente para predecir la capacidad del anticuerpo para estimular la remielinización.

La FIGURA 13 muestra que un ebvHlgM puede estimular la remielinización en ratones infectados con TMEV. Fotomicrografías ópticas de regiones de patología de la mielina en médulas espinales de ratones SJL/J infectados crónicamente con TMEV. Se observa extensa remielinización del SNC, caracterizada por vainas de mielina finas en relación con el diámetro del axon, en ratones tras el tratamiento con ebvHlgM MSI19D10 (A). Se observó desmielinización sin remielinización significativa en ratones tratados con ebvHlgM AKJR4 (B). Secciones embebidas en radita se tiñeron con 1 % de p-fenilendiamina. De nuevo, parece que la especificidad fuerte del SINC es uno de los requisitos para que un anticuerpo estimule la remielinización in vivo, pero sola no es suficiente para predecir la capacidad del anticuerpo para estimular la remielinización.

La FIGURA 14 presenta la cuantificación de axones mielinados en lesiones de lisolecitina tratadas con IgM policlonal humana. Los axones remielinizados/mm2 en lesiones de lisolecitina tratadas frente a sin tratar. Hay un número significativamente mayor de axones mielinados en lesiones de lisolecitina tratadas con IgM policlonal humana que los animales tratados con IgG policlonal humana ($p < 0,05$). Un animal del grupo control con PBS remielinizó de forma espontánea y, por tanto, la diferencia entre los grupos tratados con anticuerpo humano y el grupo control no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

La FIGURA 15 demuestra que los anticuerpos humanos son polirreactivos a los haptenos químicos mediante ELISA. Las especificidades de unión a antígeno de las inmunoglobulinas se evaluaron mediante ELISA directo. Reactividades químicas de hapteno de IgM policlonal humana, IgG policlonal humana. Abreviaturas usadas en estas figuras: NP, (4-hidroxi-3-nitrofenil)acetilo; PhoX, feniloxazolona; TMA, azofeniltrimetilamonio; FITC, fluoresceína; PC, azofenilfosforil-colina; ARS, azofenilarsonato; TNP, trinitrofenil acetilo.

La FIGURA 16 muestra que los anticuerpos humanos son polirreactivos a la autoproteína mediante ELISA. Las especificidades de unión a antígeno proteico de las inmunoglobulinas se evaluaron mediante ELISA directo. Abreviaturas usadas en estas figuras: MBP, proteína básica de la mielina; KLH, hemocianina de lapa californiana; HEL, lisozima de huevo de gallina; BSA, seroalbúmina bovina; Rbt, conejo; Bo, bovino; Mo Hb, hemoglobina de ratón.

La FIGURA 17 presenta las secuencias de la región variable de la cadena pesada de sHlgM 22. La secuencia está alineada de acuerdo con el sistema de numeración de las secuencias VH humanas en la publicación: Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol I, Quina Edición (1991), Kabat E.A., Wu, T.T., Perry, H.M. Gottesman, K.S. y Foeller, C., NIH Publication. La VH de sHlgM 22 es un miembro del subgrupo III de VH. Los aminoácidos subrayados se han confirmado mediante secuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de nucleótidos de sHlgM 22. Las secuencias de tipo A y B de VH de SHlgM 22 se representan sólo con nucleótidos que difieren de las secuencias de la línea germinal de IGHV3-30/3-30-05*01, IGHJ4*02 y IGHD2- 21*02. Dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia proteica de la VH de sHlgM 22 de tipo B están impresas en negrita. Las secuencias de la VH de sHlgM 22 de tipo A y de tipo B coincidieron más estrechamente con la secuencia de la línea germinal de IGHV3-30/3-30-5*01 (homología del 96 %). Referencias para las secuencias de la línea germinal: IMGT, base de datos internacional ImMunoGeneTics [<http://imgt.cnusc.fr:8104>]. (Iniciador y coordinador: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia)

La FIGURA 18 presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera de sHlgM 22. La secuencia está alineada de acuerdo con el sistema de numeración de las secuencias VH humanas en la publicación: Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol I, Quina Edición (1991), Kabat E.A., Wu, T.T., Perry, H.M. Gottesman, K.S. y Foeller, C., NIH Publication. Vλ de sHlgM 22 es un miembro del subgrupo lambda I.

Los aminoácidos subrayados se han confirmado mediante secuenciación proteica. La secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de nucleótidos de sHlgM 22. Las secuencias de tipo I y II de V λ de SHlgM 22 se representan sólo con nucleótidos que difieren de las secuencias de la línea germinal de IGLV1-51*01 y IGLJ3*01. Dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia proteica de la V λ de sHlgM 22 de tipo II están impresas en negrita. Las secuencias de de sHlgM 22 coincidían más estrechamente con la secuencia de la línea germinal IGLV-51*01 (homología del 97 %). Los dos genes difieren de su ancestro común en un solo cambio de nucleótido. Referencias para las secuencias de la línea germinal: IMGT, base de datos internacional ImMunoGeneTics [<http://imgt.cnusc.fr:8104>]. (Iniciador y coordinador: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia)

La FIGURA 19 presenta las secuencias de la región variable de la cadena pesada de ebvHlgM MSI19D10.

La FIGURA 20 presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera de ebvHlgM MSI19D10.

La FIGURA 21 demuestra que los anticuerpos monoclonales que estimulan la remielinización producen un flujo de Ca²⁺ en las células gliales en cultivo. Los tres paneles demuestran las respuestas de Ca²⁺ de las células gliales a cuatro anticuerpos diferentes. Dos que estimulan la remielinización in vivo, sHlgM 22 (A) y SCH94.03 (B), y dos que no estimulan la remielinización, sHlgM 14 (panel C) y CH12 (C). Las células que respondieron exhibían uno de dos tipos diferentes de contaminantes de calcio, un pico rápido inmediatamente tras la adición del anticuerpo (A y B, trazas rojas) o un pico más ancho que aparece con un retraso corto tras la adición del anticuerpo (A y B, trazas negras). Los triángulos pequeños coloreados en el eje del tiempo representan el momento en el que se añadió el anticuerpo (o ionóforo). Los anticuerpos sHlgM 22 and SCH94.03 provocaron ambos tipos de respuestas, pero de diferentes subpoblaciones de células gliales (paneles A y B). Los anticuerpos sHlgM14 y CH12, que no estimulan la remielinización in vivo, no se observó que causaran el flujo de calcio en cultivos de glía (panel C). Al final de cada experimento, el ionóforo de calcio Br-A23187 se añadió a cada cultivo como control de la integridad celular. La adición del ionóforo a células viables produce una gran entrada de Ca²⁺ que es evidente en cada uno de los experimentos que se representan.

La FIGURA 22 demuestra que sHlgMs y ebvHlgMs se unen a neuronas primarias en cultivo. El marcaje con 15 inmunofluorescencia indirecta de células granulares de rata primarias vivas a los seis días en cultivo, sHlgM 12 se une a casi todos los axones y extensiones dendríticas de células granulares cerebelares en cultivo (A). El patrón de unión es similar al observado con los anticuerpos anti-gangliósidos, tal como el anticuerpo A2B5 de ratón. Se ha demostrado que A2B5 estimula la remielinización in vivo (Asakara y col., 1998). ebvHlgM CB2iE12 solo se une a cuerpos celulares granulares y a sus extensiones axonales proximales (B). El antígeno reconocido por CB2iE12 está regulado en el desarrollo, ya que células granulares en cultivo son negativas para la tinción con CB2iE12 hasta 4-5 días después de la siembra en la placa. Aumento x.

La FIGURA 23 demuestra que el anticuerpo monoclonal de ratón SCH94.03 se une a la superficie de las células granulares en cultivo. Marcaje con inmunofluorescencia indirecta y la imagen confocal en serie demuestra que el anticuerpo monoclonal de ratón SCH94.03 se une a la superficie de las neuronas granulares en cultivo. La serie de imágenes se tomó separadas por 1 μ m y claramente muestran los anillos circulares concéntricos previstos de un cuerpo celular esférico marcado externamente con extensiones del proceso.

La FIGURA 24 representa la metodología usada para cuantificar la sustancia blanca, la patología de la sustancia blanca y la remielinización en las médulas espinales de ratones infectados con TMEV. Fotomicrografías ópticas de una sección de médula espinal a nivel torácico de un ratón SJL/J infectado crónicamente con TMEV y tratado con IgM policlinal humana (A). La sustancia blanca en la periferia se tiñe de forma más oscura que la sustancia gris central más clara. El área de sustancia blanca total está trazada (indicada por las líneas rojas) con un aumento de 40x. Después, las áreas de patología de la sustancia blanca están trazadas (indicada por las líneas verdes) con un aumento de 100x. En este ejemplo, las áreas de patología de la sustancia blanca aparecen como áreas más ligeras en la periferia de la sección. Por último, a un aumento de 250x, las áreas de remielinización de OL (indicadas por las líneas azules) y de remielinización de SC (indicadas por la línea amarilla) están trazadas. La remielinización de OL se caracteriza por vainas finas de mielina en relación con el diámetro del axon. El porcentaje de área de patología de la sustancia blanca se calcula dividiendo el área de color verde por el área de color rojo x 100. El porcentaje de área de remielinización de OL se calcula dividiendo el área de color azul por el área de color verde x 100. Se trazan diez secciones transversales de médula espinal para cada animal considerado y las áreas se combinan para calcular una puntuación para dicho animal. En general, en cada grupo experimental se tratan 7-8 animales para contar con las muertes y con los animales que no contienen al menos un 5 % de patología de sustancia blanca. Normalmente, 4-5 animales tratados cumplen los criterios de inclusión en el conjunto de datos final. Un campo de aumento alto de la sustancia blanca de la columna dorsal (B, del área indicada con el asterisco en A) demuestra una remielinización de OL significativa (flecha). Las barras a escala son 250 μ m

en A y 20 µm en B.

La FIGURA 25 tras tratamiento con Ac humanos, ratones infectados crónicamente con TMEV demuestra remielinización significativa de OL. Microfotografías ópticas de áreas representativas de patología de sustancia blanca de la médula espinal de diferentes grupos de tratamiento. El tratamiento con IVIg tuvo como resultado una significativa remielinización de OL (A). Se observó una remielinización casi completa, caracterizada por vainas de mielina finas densamente empaquetadas en relación con el diámetro del axon (B, punta de la flecha), en secciones de médula espinal de ratones tras el tratamiento con IgM policlonal humana (B) y AcMo humanos sHIgM 22 (F) y sHIgM46 (G). En contraste, tras el tratamiento con AcMo sHIgM1 (C), sHIgM2 (D), sHIgM14 (E) o PBS (H), los ratones mostraron patología de la sustancia blanca sin una remielinización significativa de OL. También fueron evidentes las células inflamatorias infiltrantes y los macrófagos que ingieren los restos de mielina (A, punta de flecha), signos de destrucción activa de mielina. Secciones transversales de médula espinal en cuatro de ocho animales tratados con sHIgM22 y cinco de cinco animales tratados con sHIgM46 contenían al menos un área de remielinización de OL casi confluyente, un acontecimiento raro que indica significativa reparación tisular. En contraste, las 10 secciones transversales de médula espinal de cada ratón tratado con sHIgM1, sHIgM2, sHIgM14 o PBS no contenían ninguna. La barra de escala es de 20 mm.

FIGURA 26 Los AcMo humanos aislados por su capacidad para unirse a OL de rata también se unen a la superficie de OL humanos en cultivo. sHIgM14 (A), que no estimularon la remielinización y sHIgM22 (B) y sHIgM46 (C), que estimularon la remielinización, se unieron al pericarion y elaboraron el proceso y las extensiones de membrana de los OL humanos positivos para sulfatida mantenidos en cultivo durante 3 semanas. sHIgM2 (D, canal verde) es un ejemplo de AcMo humano que no se unió a los OL humanos positivos para sulfatida (D, canal rojo). Los núcleos se marcan con color azul. IVIg, IgM policlonal humana y los AcMo humanos sHIgM1 y sHIgM2 no se unieron a la superficie de los OL humanos en ningún punto de tiempo analizado. La barra de escala es de 25 mm.

La FIGURA 27 presenta la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo CB2b-G8 transformante con EBV.

La FIGURA 28 presenta la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo CB2b-G8 transformante con EBV.

La FIGURA 29 Amplificación del ARN de la cadena ligera y expresión de proteínas en células de hibridoma transfeccionadas mediante amplificación con metotrexato de un plásmido de expresión que contiene dHfR. El plásmido de expresión que contiene la secuencia de codificación para la cadena ligera kappa 94.03 humanizada bajo el control del promotor del MCV junto con un gen de dHfR unido bajo el control del promotor de SV40 se introdujo mediante electroporación en la línea celular de hibridoma humano/de ratón F3B6 negativa para inmunoglobulina. Las células bajo selección con metotrexato mínimo (0,5 µg/ml) y las que habían sufrido una selección más rigurosa (52,1 µg/ml) se cultivaron para recoger el sobrenadante para evaluar la secreción de la cadena ligera y ARN para evaluar la expresión del gen de la cadena ligera. El análisis de transferencia de tipo northern indica una amplificación sustancial de la expresión de ARN en un clon (nº 5). La expresión proteica aumentó tras la selección con metotrexato en el clon 4, pero no en el clon 5. Estos hallazgos indican que la amplificación con metotrexato en ocasiones tiene como resultado la amplificación del ARNm y de la expresión proteica mediante genes estrechamente unidos, pero, en otros casos, no se observa amplificación de la transcripción ni de la síntesis proteicas.

La FIGURA 30 Los vectores amplificables que codifican 94.03 humanizado y sHIgM 22. El panel superior es el vector prototipo que contiene la secuencia de codificación de la cadena ligera 94.03 (κ) y una construcción genómica híbrida que codifica la cadena pesada (μ) 94.03. El panel inferior es una construcción similar que contiene las secuencias de codificación derivadas de la secuencia de sHIgM 22.

La FIGURA 31 Cerebelo de rata posnatal teñido con 94.03 murino y humanizado. Secciones de cerebelo se tiñeron con 94.03 de ratón y humanizado. El anticuerpo unido se localizó usando reactivo de anticuerpo secundario fluorescente específico de IgM de ratón o humano, respectivamente. Ambos anticuerpos mostraron similares patrones de tinción a los de la sustancia blanca y los astrocitos del cerebelo.

La FIGURA 32 Aislamiento de una variante de IgG de 94.03. Una variante de desplazamiento natural de 94.03 se aisló del cultivo clasificando según las células que expresan IgG en su superficie. Se muestran los perfiles de antes y después de la clasificación de los cultivos celulares. Las células IgG se aislaron de la población posclasificación mediante clonación por dilución límite. El anticuerpo producido se identificó como IgG1 usando anticuerpos específicos de isotipo de IgG.

La FIGURA 33 Demostración de que las células productoras de IgG1 eran, de hecho, una variante de 94.03. El ARN se aisló de las células que expresan IgG1. El ADNc se generó usando RT-PCR con cebadores

específicos de la región variable de 94.03 y la región constante del isotipo κ 1. El ADN resultante se secuenció para demostrar la unión de corte y empalme precisa prevista para una variante de desplazamiento espontáneo.

5 La FIGURA 34 presenta la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 09 de ratón.

La FIGURA 35 presenta la secuencia de la región variable de la cadena ligera kappa 1 de la secuencia de la región variable de 09 de ratón del anticuerpo 09 de ratón.

10 La FIGURA 36 presenta la secuencia de la región variable de la cadena ligera kappa 2 del anticuerpo 09 de ratón.

La FIGURA 37 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena pesada de AKJR4.

15 La FIGURA 38 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa de AKJR4.

La FIGURA 39 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena pesada de CB2iE12.

20 La FIGURA 40 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa de CB2iE12.

La FIGURA 41 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena pesada de CB2iE7.

25 La FIGURA 42 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa de CB2iE7.

La FIGURA 43 de referencia presenta las secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa de MSI 19E5.

30 La FIGURA 44 presenta la cadena ligera kappa 2 del anticuerpo 04 de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 La presente invención se refiere a la estimulación, regeneración, protección y/o remielinización de los axones del sistema nervioso central en un mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a autoanticuerpos para usar en procedimientos de estimulación de la remielinización de los axones sistema nervioso central (SNC) usando un anticuerpo, particularmente un autoanticuerpo humano, incluidos anticuerpos del subtipo IgM y monómeros de la misma o un fragmento activos de los mismos, que se caracterizan por la capacidad para
40 unirse a estructuras y células dentro del sistema nervioso central o un análogo sintético o natural de los mismos. En una realización concreta, los anticuerpos proporcionados en el presente documento y usados en los procedimientos de la presente invención se caracterizan por su capacidad para unirse a oligodendrocitos y, además, en particular, son capaces de estimular la proliferación de células gliales.

45 De acuerdo con la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de biología molécula, microbiología y de ADN recombinante, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., "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" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & 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).

55 Por tanto, si aparecen en el presente documento, los términos siguientes tendrán las definiciones que se indican a continuación.

60 Con la expresión "agente(s) neuromodulador(es)", como se usan en el presente documento de forma singular a lo largo de la presente solicitud y reivindicaciones, se quiere hacer referencia a una amplia clase de materiales que funcionan estimulando el sobrecrecimiento de neuritas, la regeneración y la remielinización con beneficios y efectos concretos sobre el SNC y, por tanto, incluye los anticuerpos de la presente invención, incluyendo los anticuerpos del subtipo de IgM y monómeros de los mismos, y, particularmente, los autoanticuerpos humanos proporcionados en el presente documento, incluidos en las Tablas 2 y 3 en el presente documento, y, más particularmente, en el presente documento se refiere a sHlgM22 (LIM 22), sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10, y
65 CB2bG8, análogos peptídicos, haptenos, monómeros, fragmentos activos de los mismos, agonistas, miméticos y

similares, incluyendo dichos materiales ya que pueden tener una similitud al menos parcial con las secuencias peptídicas indicadas en las FIGURAS 17-20, 27 y 28. Agente(s) neuromodulador(es) también incluye y abarca combinaciones o mezclas de más de uno de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, incluidos monómeros o fragmentos activos de los mismos.

Asimismo, las expresiones "agente neuromodulador", "autoanticuerpo", "péptido de anticuerpo", "péptido", "hapteno" y cualquier variante no indicada específicamente, se pueden usar en el presente documento de forma intercambiable, en la medida en que pueden todos ellos hacer referencia e incluir material proteínico, incluidas proteínas sencillas o múltiples, y se extiende a las proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento y presentadas en las FIGURAS 17-20, 27, 28 y 37-43 (SEC ID N° 1, 49, 5, 50, 9, 11, 13, 15, 23, 25, 27, 29, 31, 33 y 35), y el perfil de actividades indicadas en el presente documento y en las reivindicaciones. De acuerdo con eso, asimismo se contemplan las proteínas (particularmente anticuerpos, anticuerpos sintéticos, monómeros de los mismos y fragmentos activos de los mismos) que muestran una actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, como las modificaciones obtenidas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como las obtenidas mediante mutaciones en huéspedes que producen el complejo o sus subunidades citadas. Asimismo, las expresiones "agente neuromodulador", "autoanticuerpo", "péptido de anticuerpo", "péptido", "hapteno" están destinadas, cuando se adecuado, a incluir dentro de su alcance las proteínas específicamente citadas en el presente documento, así como todos los análogos sustancialmente homólogos y variaciones alélicas.

Los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento se prefiere que estén en la forma isomérica "L". No obstante, los residuos en la forma isomérica "D" pueden estar sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada de unión a inmunoglobulina. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura estándar de polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 letra	3 letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Cabe citar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en la presente documento por formulas cuya orientación a la izquierda o a la derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi. Además, cabe destacar que una barra inclinada al principio o final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia posterior de uno o más residuos de aminoácidos. La tabla anterior se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y de una letra que pueden aparecer alternativamente en el presente documento.

Un “replicón” es cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN un vivo, es decir capaz de replicarse bajo su propio control.

Un “vector” es un replicón, como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ADN de forma que se realiza la replicación del segmento unido.

Una “molécula de ADN” se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma monocatenaria o una hélice bicatenaria. Este término sólo se refiere a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a una forma terciaria concreta. Por tanto, este término incluye ADN bicatenario que se encuentra, entre otros, en moléculas de ADN lineal (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al tratar la estructura de las moléculas de ADN bicatenario concreto, las secuencias se pueden describir en el presente documento de acuerdo con la convención normal de proporcionar únicamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Un “origen de replicación” se refiere a las secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

Una “secuencia codificadora” de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y se traduce en un polipéptido in vivo cuando se introduce bajo el control de las secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificadora puede incluir, entre otras, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (p. ej., de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se localizarán en 3' de la secuencia de codificación.

Las secuencias de control de la transcripción y de la traducción 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.

Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora (dirección 3') posterior. Para los fines de definir la presente invención, la secuencia promotora se une a su extremo 3' mediante el sitio de inicio de la transcripción y se extiende hacia arriba (en dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del normal. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (convenientemente definido mediante mapeo con la nucleasa S1), así como los dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, aunque no siempre, contienen cajas “TATA” y cajas “CAT”. Los promotores eucariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso de -10 y -35.

Una “secuencia de control de la expresión” es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificadora está “bajo el control” de las secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que a su vez se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificadora.

Se puede incluir una “secuencia señal” antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal del polipéptido, que comunica a la célula huésped a dirigir el polipéptido a la superficie de la célula o a los orgánulos en el interior de la célula o a secretar el polipéptido en el medio y este péptido señal normalmente es escindido de la célula huésped antes de que la proteína salga de la célula. Las secuencias señal se pueden encontrar asociadas con una diversidad de proteínas nativas de procariotas y eucariotas.

El término “oligonucleótido”, como se usa en el presente documento en referencia a las sondas de la presente invención, se define como una molécula compuesta por dos o más ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Si tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función última y uso del oligonucleótido.

El término “cebador”, como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se introduce en las condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador, que

es complementario a una hebra de ácido nucleico, se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y debe ser lo bastante largo como para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluidos la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico normalmente contiene 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores del presente documento se seleccionan de modo que sean “sustancialmente” complementarios a diferentes hebras de una secuencia de ADN diana concreta. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras. Por tanto, la secuencia del cebador no tiene que reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede estar unido al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria a la hebra. Como alternativa, las bases no complementarias o secuencias más largas pueden estar entrelazadas en el cebador, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la hebra para hibridar con ella y, de este modo, formar el molde para la síntesis del producto de extensión.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula se ha “transformado” con ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se ha introducido en el interior de la célula. El ADN transformante puede o no integrarse (unido de forma covalente) en el ADN cromosómico que compone el genoma de la célula. En procariotas, células de levadura o de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un elemento episomal, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada de forma estable es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de modo que es heredada por las células hija a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hija que contienen el ADN transformante. Un “clon” es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común mediante mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable in vitro para muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente el 75 % (preferentemente al menos aproximadamente el 80% y más preferentemente al menos aproximadamente 90 o 95 %) de los nucleótidos coinciden con una longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias usando un software estándar disponible en los bancos de datos de secuencia o en un experimento de hibridación de tipo southern en, por ejemplo, condiciones estrictas tal y como se define para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis y col., supra; DNA Cloning, Vols. I & II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra. En concreto, las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de la presente invención son sustancialmente homólogas a una secuencia génica de línea germinal correspondiente, que tiene una homología de al menos aproximadamente un 90 % con una secuencia génica de línea germinal correspondiente.

Debe apreciarse que dentro del alcance de la presente invención también se encuentran las secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la invención o un análogo peptídico, hapteno, o fragmento activo del mismo, que codifican un péptido que define en al menos una porción del mismo o tiene la misma secuencia de aminoácidos que se indica en las FIGURAS 17-20, 27 y 28 (SEC ID N° 1, 49, 5, 50, 9, 11, 13, 15,), pero que son degeneradas para las mismas SEC ID NO° Por “degenerado con” se quiere decir que se usa un codón diferente de tres letras para especificar un aminoácido concreto. Es bien sabido en la técnica que se pueden usar los codones siguientes de forma intercambiable para codificar cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe 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
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
Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
Histidina (His o H)	CAU o CAC
Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG

Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC

Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
Triptófano (Trp o W)	UGG
Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Debe entenderse que los codones especificados anteriormente son para secuencias de ARN. Los codones correspondientes para ADN tiene T en lugar de U.

Se pueden realizar mutaciones en una secuencia o molécula de ADN concreta de modo que dicho codón concreto se cambia a un codón que codifica un aminoácido diferente. En general, dicha mutación se realiza haciendo los menos cambios nucleotídicos posibles. Una mutación de sustitución de este tipo se puede realizar para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de un modo no conservador (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica concretos de un aminoácido perteneciente a otro grupo) o de un modo conservador (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica concretos un aminoácido perteneciente al mismo grupo). En general, dicho cambio conservador conduce a menos cambio en la estructura y la función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad y función de la proteína resultante. Debe considerarse que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o las características de unión de la proteína resultante.

A continuación se presenta un ejemplo de varios grupos de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

Alanina
Valina
Leucina
Isoleucina
Prolina
Fenilalanina
Triptófano
Metionina

Aminoácidos con grupos R polares sin carga

Glicina
Serina
Treonina
Cisteína
Tirosina
Asparagina
Glutamina

Aminoácidos con grupos R polares cargados (con carga negativa a pH 6,0)

Ácido aspártico
Ácido glutámico

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

Lisina
Arginina
Histidina (a pH 6,0)

Otro grupo puede ser los aminoácidos con grupos fenilo:

Fenilalanina

Triptófano
Tirosina

Otro grupo puede ser según el peso molecular (es decir, el tamaño de los grupos R):

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

Sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys por Arg y viceversa, de modo que se pueda mantener una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa, de modo que se pueda mantener una carga negativa;
- Ser por Thr de modo que se pueda mantener un -OH libre; y
- Gln por Asn de modo que se pueda mantener un -NH₂ libre.

Las sustituciones de aminoácidos también se pueden introducir para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys con un posible sitio para puentes disulfuro con otra Cys. Se puede introducir una His como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, la His puede actuar como ácido o base y es el aminoácido más frecuente en la catálisis bioquímica). Se puede introducir Pro porque su estructura particularmente planar, que induce giros β en la estructura de la proteína.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70% de los residuos de aminoácidos (preferentemente al menos aproximadamente el 80% y más preferentemente al menos aproximadamente 90 o 95%) son idénticas o representan sustituciones conservadoras. En concreto, las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de la presente invención son sustancialmente homólogas a una secuencia de aminoácidos de línea germinal correspondiente, que tiene una homología de al menos aproximadamente un 90%, y preferentemente de al menos aproximadamente 95 %, con una secuencia de aminoácidos de línea germinal correspondiente.

Una región "heteróloga" de la construcción de ADN es un segmento identificable de ADN en una molécula de ADN más grande que no se encuentra asociada con la molécula más grande en la naturaleza. Por tanto, 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 de codificación heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia de codificación no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADN c en el que la secuencia de codificación genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a los del gen nativo). Las variaciones alélicas o acontecimientos mutacionales naturales no producen una región heteróloga de ADN como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" es una inmunoglobulina, que incluye anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. Con el término se pretende abarcar anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, este último mencionado se describe con mayor detalle en las patentes de EE.UU. nº 4.816.397 y 4.816.567. Dichos anticuerpos podrían incluir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales preparados mediante técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos (quiméricos) y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que las hacen adecuadas para uso diagnóstico adicional junto con su capacidad para modular la actividad, por ejemplo que estimula la remielinización y/o la regeneración de los axones del SNC o que proporciona neuroprotección. Un "sitio de combinación de anticuerpo" es la porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones variables e hipervariables de las

5 cadenas pesada y ligera que se une específicamente al antígeno. La expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales, como se usa en el presente documento, contempla molécula de inmunoglobulina intacta y una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina- Ejemplos de moléculas de anticuerpo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las porciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratope, incluidas las porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

10 Las porciones Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo se pueden preparar mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre de moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas mediante procedimientos bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.342.566 concedida a Theofilopolous y col.). Las porciones Fab' de moléculas de anticuerpo también son bien conocidas y se puede producir a partir de porciones F(ab')₂, seguido de la reducción de los puentes disulfuro que unen las dos porciones de cadenas pesadas, como con mercaptoetanol, y seguido de alquilación de la proteína resultante mercaptán con un reactivo tal como yodoacetamida.

15 La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus varias formas gramaticales hace referencia a un anticuerpo que solo tiene una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno concreto. Por tanto, un anticuerpo monoclonal normalmente muestra una afinidad de unión sencilla por cualquier antígeno con el que inmunorreaccione. Por tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente, por ejemplo un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

20 La metodología general para fabricar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales también se pueden crear mediante técnicas distintas a la fusión, tal como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o transfección con el virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier y col., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T- cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); véase también las patentes de EE.UU. nº 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.

25 Paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra péptidos agentes neuromoduladores o péptidos de autoanticuerpos se pueden someter a detección selectiva para varias propiedades, es decir isotipo, epítipo, afinidad etc. De interés concreto son los anticuerpos monoclonales capaces de unirse a estructuras y células en el sistema nervioso central y que exhiben la misma actividad que los agentes neuromoduladores y, en particular, los presentes autoanticuerpos. Dichos anticuerpos se pueden someter fácilmente a detección selectiva y caracterizarse en ensayos, incluidos procedimientos de unión, tinción e inmunohistoquímica presentados e ilustrados en el presente documento. Dichos monoclonales se pueden identificar con facilidad en ensayos de actividad, tal como los modelos del virus de Theilers, EAE e lisolecitina presentados e ilustrados en el presente documento. Los anticuerpos de alta afinidad también son útiles cuando es posible la purificación de inmunoespecificidad de los autoanticuerpos nativos o recombinantes.

30 Preferentemente, el anticuerpo anti-péptido usado en los procedimientos terapéuticos y diagnósticos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal (AcMo), más preferentemente un anticuerpo humano o humanizado. Preferentemente, el anticuerpo es también un anticuerpo sintético. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-péptido usadas estén en forma de las porciones Fab, Fab', F(ab')₂ or F(v) de las moléculas de anticuerpo enteras.

35 Como se ha sugerido antes, el procedimiento diagnóstico de la presente invención comprende analizar una muestra o medio celular por medio de un ensayo que incluye una cantidad eficaz de un antagonista frente a un péptido de anticuerpo/proteína, tal como un anticuerpo anti-péptido, preferentemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad y, más preferentemente, un AcMo. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-péptido usadas estén en forma de las porciones Fab, Fab', F(ab')₂ or F(v) de las moléculas de anticuerpo enteras. Como se ha tratado anteriormente, los pacientes capaces de beneficiarse de este procedimiento incluyen los que sufren una afección neurológica, tal como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, una infección vírica u otra desorganización neuropatológica, incluidos los daños resultantes de traumatismos físicos. Procedimientos para aislar los péptidos e inducir anticuerpos anti-péptidos y para determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos anti-péptidos para ayudar en el análisis de las células diana son bien conocidos en la técnica.

40 Los procedimientos para producir anticuerpos anti-poli-peptídicos policlonales son bien conocidos en la técnica. Véase la patente de EE.UU. nº de 4.493.795 a Nestor y col. Un anticuerpo monoclonal, que normalmente contiene las porciones Fab y/o F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, se puede preparar usando la tecnología de hibridomas descrita en Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), que se incorpora en el presente documento por referencia. Brevemente, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, se fusiona un mieloma u otra línea celular de autoperpetuación con linfocitos obtenidos del bazo de un mamífero hiperinmunizado con una porción de unión del

péptido de anticuerpo del mismo, o el péptido o fragmento de anticuerpo, o una porción de unión a ADN específico de origen del mismo.

Normalmente los esplenocitos se fusionan con células de mieloma usando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan según su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención se identifican por su capacidad para inmunorreaccionar del mismo modo que los presentes autoanticuerpos y su capacidad para estimular o inhibir la actividad especificada en las células y tejidos diana.

Un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención se puede producir iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio de nutrientes que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno adecuada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo al medio. El medio que contiene anticuerpo se recoge. Las moléculas de anticuerpo pueden aislarse después mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones endogámicos y similares. Un ejemplo de medio sintético es medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM; Dulbecco y col., *Viol.* 8:396 (1959) suplementado con 4,5 gm/l de glucosa, glutamina 20 mm y 20 % de suero bovino fetal. Un ejemplo de cepa de ratón endogámico Balb/c.

Los procedimientos para producir anticuerpos antipéptido monoclonales son bien conocidos en la técnica, Véase Niman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4949-4953 (1983). Normalmente, los péptidos de anticuerpo presentes, o un análogo o fragmento peptídico, se usan solos o conjugados con un vehículo inmunogénico, como inmunógeno, en el procedimiento descrito anteriormente para producir anticuerpos antipéptido monoclonales. Los hibridomas se someten a detección selectiva de la capacidad de producir un anticuerpo que inmunorreacciona como en análogo de péptido de anticuerpo y, de este modo, reacciona de un modo similar con los anticuerpos de la presente invención.

La presente invención también se refiere a anticuerpos humanos sHlgM22, sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10, CB2bG8, monómeros de los mismos, análogos de los mismos, incluidos haptenos, fragmentos activos de los mismos, o autoanticuerpos aislados o sintéticos que tienen las características de los mismos para usar en procedimientos de tratar enfermedades desmielinizantes en mamíferos, tales como esclerosis múltiple en seres humanos, y enfermedades virales del sistema nervioso central de seres humanos y animales domésticos, tales como encefalomiелitis postinfecciosa, anticuerpos humanos sHlgM22, sHlgM46, ebvHlgM, MSI19D10, CB2bG8, monómeros de los mismos, análogos de los mismos incluyendo haptenos, fragmentos activos de los mismos o un anticuerpo aislado o sintético que tiene las características de los mismos. Los procedimientos de tratamiento profiláctico usando estos AcMo, monómeros de los mismos, fragmentos activos de los mismos, u otros anticuerpos aislados o sintéticos que tienen las mismas características, incluyendo inhibir el inicio o progresión de enfermedades desmielinizantes también se abarcan por esta invención.

Los oligodendrocitos (OL), las células formadoras de mielina del sistema nervioso central (SNC), se originan como células neuroectodérmicas de las zonas subventricular y, después, migran y maduran para producir mielina. El desarrollo secuencial de los OL se identifica mediante marcadores específicos de la etapa de diferenciación bien caracterizada. Los precursores bipolares proliferativos y migratorios, designados progenitores de oligodendrocito/astrocito de tipo 3 (O-2A) se identifican mediante anticuerpos monoclonales anti-GD3 y A2B5 [Eisenbarth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979), 4913-4917]. La siguiente etapa de desarrollo, caracterizada por células multipolares, proliferativas y posmigratorias es reconocida por el AcMo 04 [Gard y col., *Neuron*, 5 (1990), 615-625; Sommer y col., *Dev. Biol.*, 83, (1981), 311-327]. El desarrollo adicional se define por la expresión en la superficie celular de galactocerebrósido, reconocido por el AcMo 01 [Schachner, *J. Neurochem.*, 39 (1982), 1-8; Sommer et al., *supra*], y mediante la expresión del 2',3'-cálcico nucleótido 3'-fosfohidrolasa. La mayoría de las células maduras expresan marcadores de diferenciación terminal, tal como la proteína básica de la mielina y la proteína proteolípida.

Los AcMo (A2B5, O1, y 04) usados para caracterizar las etapas de desarrollo de los OL se prepararon inmunizando ratones BALB/c con células de retina de embrión de pollo u homogeneizado del cuerpo calloso bovino [Eisenbarth y col., *supra*; Sommer y col., *supra*]. A2B5 no solo reconoce los progenitores O-2A, sino que también las neuronas y reacciona con el gangliósido de superficie celular GQ1c [Kasai y col., *Brain Res.*, 277 (1983), 155-158] y otros gangliósidos [Predman y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 233 (1984), 661-666]. 04 reacciona con sulfatada, seminolípido y colesterol [Bansal y col., *J. Neurosci. Res.*, 24 (1989), 548-557], mientras que O1 reacciona con galactocerebrósido, monogalactosil-diglicérido y psicósina [Bansal y col., *supra*]. Estos AcMo pertenecen a la subclase de inmunoglobulina (Ig) IgM y reconoce estructuras citoplasmáticas, así como los antígenos de superficie de los OL [Eisenbarth et al., *supra*; Sommer et al., *supra*]. El AcMo de ratón HNK-1 (anti-Leu-7), preparado inmunizando ratones BALB/c con la suspensión de la membrana de células linfoblastoides HSB-2 T, se dio a conocer primero como un marcador para células asesinas naturales [Abo et al., *J. Immunol.*, 127 (1981), 1024-1029]. Más

tarde, se demostró que HNK-1 compartía determinantes antigénicos con el sistema nervioso [Schuller-Petrovic et al., Nature, 306 (1983), 179-181]. El epítipo del carbohidrato sobre la glicoproteína asociada con la mielina, encontrado en las vainas de mielina centrales y periféricas se demostró que era un antígeno principal del tejido nervioso que reaccionó con HNK-1 [McGarry et al., Nature, 306 (1983), 376-378]. No obstante, otras glicoproteínas del tejido nervioso reaccionan con este AcMo, algunas de las cuales son importantes en la embriogénesis, diferenciación y mielinación [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 estructuras citoplasmáticas y pertenece a la subclase de Ig IgM.

Un anticuerpo monoclonal, divulgado y reivindicado en la patente de EE.UU. número 5,591,629, presentada el 7 de enero de 1997, y designado SCH94.03, se encontró que estimula la remielinización del SNC en ratones infectados crónicamente por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) [Miller et al., J. Neurosci., 14 (1994), 6230-6238]. SCH94.03 pertenece a la subclase de Ig IgM(x) Ig y reconoce un antígeno de superficie desconocida sobre los OL, pero antígenos citoplasmáticos en todas las células (Asakura et al., Molecular Brain Research, in press). La polirreactividad de SCH94.03 mediante ELISA y las secuencias de la línea germinal de la región variable de la Ig no mutada indicaron que SCH94.03 es un autoanticuerpo natural [Miller et al., J. Neurosci., 14 (1994), 6230-6238]. Un estudio cerrado de SCH94.03, y su comparación con AcMo reactivos de OL bien conocidos A2B5, O1, O4, y HNK-1 produjeron la posibilidad de que estos eran autoanticuerpos naturales. Un análisis posterior de las secuencias de ADNc de la región variable de la Ig y la polirreactividad de estos AcMo mediante ELISA confirmaron que este es un grupo genérico de autoanticuerpos naturales que tienen utilidades similares.

La reactividad antigénica del anticuerpo monoclonal, el anticuerpo monoclonal IgM SCH 94.03 (también denominado SCH94.32) y SCH 79.08 (ambos preparados de un mamífero inmunizado con homogeneizado de médula espinal de un mamífero normal (es decir, no infectado con ninguna enfermedad desmielinizante)) se han caracterizado y descrito en la patente de EE.UU. mencionado anteriormente número 5,591,629, presentada el 7 de enero de 1997, usando varios ensayos bioquímicos y moleculares, incluidos inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, transferencia Western, ensayos de inmunosorción ligado a enzima en fase sólida (ELISA) y secuenciación de la región variable de la Ig.

Autoanticuerpos naturales o fisiológicos normalmente están presentes en el suero y se caracterizan porque son reactivos o capaces de unirse a autoestructuras, antígenos o células. A menudo son polirreactivos, con frecuencia son del subtipo IgM, y están codificados por genes de línea germinal sin mutar o son sustancialmente homólogos a los genes de línea germinal con pocas diferencias de secuencia. Mediante secuenciación de los ADNc de inmunoglobulina (Ig) de los anticuerpos monoclonales reactivos con los oligodendrocitos O1, O4, A2B5, and HNK-1 IgM x y comparándolos con secuencias de línea germinal publicadas, se determinó que estos eran autoanticuerpos naturales. La V_H de O1 fue idéntica al transcrito A1 y A4 del segmento V_H, la V_H de O4 tenían tres y la V_H de HNK-1 tenía seis diferencias de nucleótidos de V_H de O1 de la línea germinal en la región de codificación de V_H. El segmento D de O1 derivó de la familia de genes Sp2 de línea germinal, JH 4, mientras que JH de O1 estaba codificada por la línea germinal J_H 1 con un cambio de nucleótido silente. Las cadenas ligeras de O1 y O4 eran idénticas al MOPC21 del mieloma a excepción de un cambio de nucleótido silente. HNK-1 V_x fue idéntica a la línea germinal V_x41 a excepción de dos cambios de nucleótidos silentes. O1Jx, O4Jx y HNK Jx estaban codificados por la línea germinal J_x2 sin mutar. En contraste la V_H de A2B5 mostró siete diferencias de nucleótidos de la línea germinal V1, mientras que no se identificó ninguna secuencia de línea germinal que codifica A2B5 V_x. O1 y O4, pero no A2B5, eran polirreactivos contra múltiples antígenos mediante ELISA directo. Por tanto, las Ig O1, O4, y HNK-1 están codificadas por los genes de la línea germinal y tienen el genotipo y el fenotipo de los autoanticuerpos naturales.

La identificación y caracterización de una familia entera de autoanticuerpos, denominados autoanticuerpos "naturales" o "fisiológicos", ha influido sobre la visión tradicional de la autoinmunidad y la autorreactividad. Los autoanticuerpos que se han estudiado ampliamente son, normalmente, IgM, aunque se han identificado otros isotipos, son reactivos frente a un amplio abanico de autoestructuras o antígenos, incluidas proteínas citoesqueléticas, proteínas de superficie, ácidos nucleicos, fosfolípidos, antígenos bacterianos tales como lipopolisacáridos, y varios haptenos químicos (revisado por Avrameas y Ternynck, Mol. Immunol., 30:1133-1142 (1993)). Los autoanticuerpos naturales comparten una extensa reactividad cruzada idiotípica o "conectividad", que incluye la expresión de idiotipos similares, algunos de los cuales son expresados por autoanticuerpos patogénicos, así como la reactividad frente a los idiotipos comunes expresados sobre otros anticuerpos. El análisis molecular ha demostrado que los autoanticuerpos naturales normalmente están codificados por los genes de inmunoglobulina (Ig) de la línea germinal sin mutar, o sustancialmente homólogos a los mismos, con pocas mutaciones somáticas, y, por tanto, representan una fracción sustancial del repertorio de Ig, especialmente en animales neonatos que no han estado expuestos de forma extensa a antígenos exógenos.

La función de los autoanticuerpos naturales sigue siendo un enigma. Se han propuesto varias hipótesis en base a sus características bioquímicas y moleculares. Estas incluyen: (1) eliminación del tejido senescente o dañado, (2) proporcionar una primera línea de defensa inmunológica en el periodo entre la exposición al patógeno y una respuesta inmunitaria específica del Ag, (3) enmascarar los autoantígenos de una respuesta autoinmunitaria potencialmente patogénica, (4) inmunomodulación, incluida la conformación del repertorio inmunológico neonato

mediante una red idiotípica y (5) participación en la selección positiva de células B en la médula ósea, similar al procedimiento propuesto para las células T en el timo.

Que determinados autoanticuerpos, ampliamente caracterizados como anticuerpos que reconocen antígenos propios y que incluyen autoanticuerpos naturales, son capaces de estimular la remielinización en el sistema nervioso central sugiere una importante función fisiológica de los autoanticuerpos. Los autoanticuerpos que se producen durante la fisiología normal o en respuesta a daños tisulares y la posterior liberación de antígenos previamente secuestrados podrían participar activamente en la estimulación de la reparación del tejido dañado. En línea con las funciones propuestas anteriormente de los autoanticuerpos, esta participación activa podría ser para facilitar la eliminación de tejido dañado, enmascarar los autoantígenos de modo que se evita una respuesta autoinmunitaria patogénica enérgica, modular la respuesta inmunitaria que realmente diera lugar a la destrucción de tejido, de modo que se permite que se produzca la reparación del tejido endógeno, o estimular directamente las células implicadas en el proceso de reparación.

Los resultados y Ejemplos que se proporcionan en el presente documento demuestran el aislamiento de los autoanticuerpos humanos, generados y seleccionados por su capacidad para unirse a los autoantígenos, particularmente capaces de unirse a estructuras y células en el sistema nervioso central. La capacidad de estos anticuerpos para estimular la remielinización del SNC también se demuestra. Los ratones infectados crónicamente con TMEV y tratados con AcMo IgM de hibridomas humanos, como ejemplos concretos sHlgM22 (LIM 22), sHlgM46, ebvHlgM MS119D10, CB2bG8, tenían una reparación del SNC significativamente mayor que los animales control, medido mediante una evaluación morfológica cuantitativa detallada de la remielinización del SNC.

Tratamiento de enfermedades desmielinizantes

Los resultados de los experimentos descritos en la presente memoria tienen aplicaciones prácticas en la esclerosis múltiple (EM), ELA y otros trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central relacionados. Se encuentran raros ejemplos de remielinización del SNC de tipo espontáneo ("placas sombreadas") en EM, y se encuentra remielinización de tipo ocasional en el sistema nervioso periférico (SNP) en placas de médula espinal desmielinizadas 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 a remielinización abortiva. El proceso de remielinización puede correlacionarse con la remisión espontánea y las mejoras observadas clínicamente en la EM. Estas observaciones clínicas indican que es posible la formación de mielina nueva en EM. La remielinización que se ha estimulado en ratones con desmielinización inducida por TEMV utilizando un mAb puede ser prometedora para aplicación terapéutica en esclerosis múltiple.

Es de importancia clínica la pregunta de si la regeneración morfológica de vainas de mielina finas contribuye a la recuperación funcional. Las simulaciones informáticas indican que la formación de mielina nueva incluso mediante vainas inapropiadamente finas mejora la conducción de impulsos. Puesto que la membrana del axón de fibras mielinizadas normalmente está altamente diferenciada, es necesario que estén presentes canales de sodio con alta densidad en el nodo de Ranvier para propagar la conducción saltatoria. Las evidencias experimentales sugieren que los nodos recién formados desarrollan la alta densidad de canal de sodio necesaria como se demuestra por la unión 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 una recuperación funcional.

El aislamiento y análisis de los autoanticuerpos humanos como se indica en el presente documento proporciona anticuerpos humanos particularmente adecuados y deseables para usar en seres humanos. Es importante el hecho de que el uso de anticuerpos humanos evita el potencial de una respuesta inmunitaria humana contra el anticuerpo terapéutico. Se ha demostrado que los anticuerpos terapéuticos derivados de animales no humanos generan una respuesta inmunitaria que puede ser significativa y perjudicial para el individuo. La IgM policlonal humana y la IgG policlonal humana se han analizado en dos modelos de desmielinización de médula espinal in vivo, un modelo de infección viral crónica y un modelo de toxicidad aguda. En ambos modelos, los animales tratados con IgM policlonal humana tenían una densidad significativamente mayor de axones recién mielinizados que los animales tratados con IgG policlonal humana. También se ha identificado un panel de anticuerpos IgM monoclonales humanos en base a su reactividad con antígenos de superficie específicos del sistema nervioso central. Estos anticuerpos humanos estimulan significativamente más remielinización del sistema nervioso central que la IgG policlonal humana cuando se administra a mamíferos con una enfermedad desmielinizante. Los anticuerpos monoclonales humanos son antogénicamente polirreactivos y reconocen determinantes sobre la superficie de los oligodendrocitos y poblaciones específicas de neuronas. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano que estimula la remielinización se ha secuenciado parcialmente. Este anticuerpo puede inducir entradas de calcio en los oligodendrocitos en cultivo, lo que sugiere la unión directa y señalización mediante las células glia. Estos anticuerpos humanos se unen a la sustancia blanca humana y pueden ser eficaces en la estimulación de la remielinización en seres humanos. Los beneficios de un anticuerpo monoclonal para usar como agente terapéutico son 1) el anticuerpo puede crecer libre

de posibles infecciones en el huésped y 2) el anticuerpo se puede alterar genéticamente *in vitro* para cambiar su eficacia.

Por tanto, como resultado de los experimentos descritos en la presente memoria, los autoanticuerpos de la presente invención pueden usarse en procedimientos para tratar mamíferos, incluyendo seres humanos y animales domésticos, aquejados por trastornos desmielinizantes, y para estimular la remielinización de axones del SNC, así como para ofrecer neuroprotección. Como se describe en el presente documento, puede administrarse una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal o fragmento peptídico, hapteno o equivalente mediante vías de administración convencionales y, en particular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.). Como se describe en el presente documento, se contemplan composiciones terapéuticas y vacunas, y se pueden preparar y administrar. Una cantidad eficaz de anticuerpo puede variar dependiendo del tamaño del mamífero que se esté tratando, de la gravedad de la enfermedad, de la vía de administración, y del curso de tratamiento. Por ejemplo, cada dosis de AcMo administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, con el intervalo preferido de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. Es importante observar que una dosis del orden de 10 µg (0,5 mg/kg) era eficaz para promover la remielinización de axones del SNC en ratones. La dosis de AcMo dependerá también de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis i.v. administrada a ratones era de 0,5 mg/kg, y la dosis i.p. era de 5,0 mg/kg. El curso de tratamiento incluye la frecuencia de administración del AcMo (por ejemplo diariamente, semanalmente, o bisemanalmente) y la duración del tratamiento (por ejemplo de cuatro semanas a cuatro meses). Por tanto, por ejemplo, puede administrarse una cantidad mayor de AcMo diariamente durante cuatro a cinco semanas, en contraposición con una cantidad menor de AcMo administrada durante cuatro meses.

La eficacia de la cantidad de anticuerpo monoclonal que se está administrando puede evaluarse utilizando cualquier serie de criterios clínicos, por ejemplo como se describe en el presente documento, incluyendo la apariencia global del mamífero, la actividad del mamífero y la extensión de la parálisis del mamífero. La eficacia de la cantidad de anticuerpo monoclonal necesaria para inducir la remielinización en seres humanos puede evaluarse también en un ensayo controlado de doble ciego. Pueden tratarse pacientes con déficit neurológicos fijos por enfermedad desmielinizante con anticuerpo monoclonal o controles. La mejora de la fuerza muscular isométrica detectada mediante ensayos musculares biomecánicos cuantitativos podría utilizarse como criterio de valoración terapéutico primario.

Los procedimientos *ex vivo* de estimular remielinización en axones del SNC están también dentro de la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede utilizarse *in vitro* para estimular la proliferación y/o diferenciación de células gliales, tales como oligodendrocitos. Estas células gliales exógenas pueden introducirse después en el SNC de mamíferos utilizando técnicas conocidas. La remielinización de axones del SNC aumentaría al aumentar el número de células gliales endógenas presentes (las células gliales tales como oligodendrocitos desempeñan un papel crítico en la producción de mielina).

Los procedimientos *in vitro* de producción de células gliales o de estimulación de la proliferación de células gliales de cultivo mixto (por ejemplo célula de nervio óptico de rata o cultivos de célula cerebral de rata) están también dentro de la presente invención. Por ejemplo, se cultivan células obtenidas de nervio óptico de rata o cerebro de rata que contienen células gliales en forma de un cultivo mixto en condiciones suficientes para promover el crecimiento de las células. Se añade después una cantidad eficaz de mAb capaz de promover la remielinización de axones del SNC, tal como as sHlgM22 (LIM 22), sHlgM46, ebvHlgM MSI19D10, y CB2bG8, al cultivo mixto de células y se mantiene en condiciones suficientes para el crecimiento y la proliferación de células. Además, se puede añadir una cantidad eficaz de AcMo, tales como AKJR4, CB2iE12, CB2iE7, o MSI19E5. En concreto, las mezclas o combinación de más de uno de los anticuerpos proporcionados en el presente documento se contemplan y proporcionan para usar en los procedimientos. El mAb estimula la proliferación de células gliales cultivadas en presencia del AcMo aumenta, respecto a la proliferación de células gliales crecidas en ausencia del mAb.

Como se ha indicado, los anticuerpos monoclonales humanos para usar en los procedimientos de la presente invención pueden administrarse, y preferentemente se hace así, como medicamentos, es decir composiciones farmacéuticas. Una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal puede combinarse, o diluirse, con un vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón fisiológico, o solución salina. En particular, combinaciones o mezclas de más de uno de los anticuerpos monoclonales en el presente documento pueden combinarse diluirse, con un vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón fisiológico, o solución salina. En el caso en el que se vaya a preparar una vacuna, el anticuerpo monoclonal o sustancia activa equivalente de la invención se puede preparar con un vehículo o adyuvante apropiado farmacéuticamente aceptable y el protocolo para la administración puede proceder de acuerdo con procedimientos estándar para inmunización conocidos para el experto en la práctica.

Las composiciones farmacéuticas usadas en los procedimientos de la presente invención para administrar a animales y seres humanos comprenden los anticuerpos monoclonales en combinación con un vehículo o excipiente farmacéutico. En una realización preferida, la composición farmacéutica puede contener más de uno, preferentemente dos, autoanticuerpos monoclonales de la presente invención. Dichas composiciones son

ventajosas en cuanto a que la presencia de más de un autoanticuerpo monoclonal potenciará la actividad de otros en la misma composición terapéutica o procedimiento.

5 El medicamento puede estar en forma de comprimidos (incluidas pastillas y gránulos), grageas, cápsulas, píldoras, ampollas o supositorios que comprenden el compuesto de la invención.

10 De forma ventajosa, las composiciones se formulan en unidades de dosificación, estando cada unidad adaptada para suministrar una dosis fija de ingredientes activos. Comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, ampollas y supositorios son ejemplos de formas de dosificación preferidas de acuerdo con la invención. Sólo es necesario que el ingrediente activo constituya una cantidad eficaz, es decir de modo que una dosis eficaz adecuada será consistente con la forma de dosificación empleada en una o múltiples dosis. Las dosis individuales exactas, así como las dosis diarias, se determinarán de acuerdo con los principios médicos estándar bajo la dirección de un médico o veterinario.

15 Los anticuerpos monoclonales también se pueden administrar como suspensiones, soluciones y emulsiones del compuesto activo en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, granulados o polvos.

20 Los diluyentes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas (p. ej., granulados) que contienen el compuesto activo adaptado para formar comprimidos, grageas, cápsulas y píldoras incluyen los siguientes: (a) cargas y expansores, por ejemplo almidón, azúcares, manitol y ácido silícico; (b) agentes de unión, por ejemplo carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona; (c) agentes hidratantes, por ejemplo glicerol; (d) agentes disgregantes, por ejemplo agar agar, carbonato cálcico y bicarbonato sódico; (e) agentes para retrasar la disolución, por ejemplo parafina; (f) aceleradores de la resorción, por ejemplo compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes de superficie activa, por ejemplo alcohol cetílico, monoestearato de glicerol; (g) vehículos de adsorción, por ejemplo caolín y bentonita; (i) lubricantes, por ejemplo talco, estearato cálcico y de magnesio y glicoles de polietileno sólido.

30 Los comprimidos, grageas, cápsulas y píldoras que comprenden el compuesto activo pueden tener los recubrimientos, cubiertas y matrices protectoras habituales, que pueden contener opacificantes. Pueden estar constituidos de modo que liberen el principio activo solo o, preferentemente, en una parte concreta del tracto intestinal, posiblemente en un periodo de tiempo. Los recubrimientos, cubiertas y matrices protectoras pueden estar hechos de, por ejemplo, sustancias poliméricas o ceras.

35 Los diluyentes que se van a usar en las composiciones farmacéuticas adaptadas para convertirse en supositorios pueden, por ejemplo, ser los diluyentes hidrosolubles habituales, tales como polietilenglicoles y grasas (p. ej., aceite de cacao y ésteres altos, [p. ej., alcohol C14 con ácido graso C16] o mezclas de estos diluyentes.

40 Las composiciones farmacéuticas que son soluciones y emulsiones pueden contener, por ejemplo, los diluyentes habituales (con, por supuesto, la exclusión mencionada anteriormente de disolventes que tienen un peso molecular inferior a 200, a excepción de la presencia de un agente de superficie activa), tales como disolventes, agentes de disolución y emulsionantes. Ejemplos específicos no limitantes de dichos diluyentes son agua, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3- butilenglicol, dimetilformamida, aceites (por ejemplo, aceite de nuez molida, glicerol, alcohol de tetrahidrofurfurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácido grasos de sorbitol o mezclas de los mismos.

45 Para administración parenteral, las soluciones y suspensiones estériles, por ejemplo agua o aceite de cacahuete, contenidas en ampollas y, en caso adecuado, son isotónicas con la sangre.

50 Las composiciones farmacéuticas que son suspensiones pueden contener los diluyentes habituales, tales como diluyentes líquidos, por ejemplo agua, agua, alcohol etílico, propilenglicol, agentes de superficie activa (p. ej., alcoholes de isoestearilo etoxilado, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, y mezclas de los mismos.

55 Las composiciones farmacéuticas pueden también contener agentes colorantes y conservantes, así como perfumes y adiciones de aromas (p. ej., aroma de aceite de menta y de aceite de eucaliptos) y agentes edulcorantes (p. ej., sacarina y aspartamo).

60 Las composiciones farmacéuticas, generalmente, contendrán de 0,5 a 90 % del ingrediente activo en peso de la composición total.

Además de los anticuerpos monoclonales, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos, por ejemplo esteroides, agentes antiinflamatorios o similares.

65 Cualquier diluyente en los medicamentos de la presente invención puede ser cualquiera de los

mencionados anteriormente en relación con las composiciones farmacéuticas. Dichos medicamentos pueden incluir disolventes de peso molecular inferior a 200 como el único diluyente.

Se ha previsto que los anticuerpos monoclonales se administren por vía peroral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica o intravenosa), rectal o localmente, preferentemente oral o parenteral, especialmente perilingual o intravenosa.

La tasa de la dosis administrada será una función de la naturaleza y el peso corporal del sujeto humano o animal que se va a tratar, la reacción individual de este sujeto al tratamiento, tipo de formulación en el que el ingrediente activo se administra, el modo en el que la administración se lleva a cabo y el punto en el progreso de la enfermedad o intervalo en el que se va a administrar. Por tanto, puede, en algunos casos, ser suficiente para usar menos que una tasa de dosificación mínima, mientras que en otros casos se debe superar el límite superior para alcanzar los resultados deseados. Cuando se administran cantidades grandes, puede ser aconsejable dividir las en varias administraciones individuales durante el curso del día.

Los agentes neuromoduladores de la invención también se pueden preparar para administrar en forma de vacunas que pueden comprender, como ingrediente activo, los autoanticuerpos citados en el presente documento, análogos peptídicos o haptenos, o, posiblemente, combinaciones de los mismos. Por tanto, la preparación de vacunas puede proceder de acuerdo con procedimientos conocidos y se contemplan vacunas monovalentes, así como polivalentes. Asimismo, se pueden preparar subunidades de vacunas de ADN, en base a las moléculas de ADN de la invención. Todas las vacunas se pueden administrar de acuerdo con prácticas estándar del médico o clínico, y dichos parámetros se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Además, en el presente documento también se describe el tratamiento mediante terapia génica, en la que el agente neuromodulador adecuado se introduce en las células diana para tratamiento, causar o incrementar la expresión del agente correspondiente. Por tanto, en una realización, el ADN o un gen que codifica el agente neuromodulador, autoanticuerpo, péptido de anticuerpo etc., o una proteína o dominio polipeptídico se introduce in vivo, ex vivo o in vitro usando un vector viral o mediante la introducción directa de ADN. La expresión en tejidos diana se puede efectuar mediante dirección del vector transgénico a células específicas, tal como con un vector viral o un ligando de receptor, o usando un promotor específico de tejido, o ambos.

Los vectores virales que normalmente se usa para los procedimientos dirigidos y de terapia in vivo o ex vivo son vectores basados en ADN y vectores retrovirales. Los procedimientos para construir y usar vectores virales se conocen en la técnica [véase, por ejemplo, Miller and Rosman, *BioTechniques* 7:980-990 (1992)].

Los vectores virales de ADN incluyen un virus de ADN atenuado o defectuosos, tal como, entre otros, virus del herpes simple (HSV), papilomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y similares. Se prefieren virus defectuosos, que carecen completamente o casi completamente, de genes virales. Los virus defectivos no son infecciosos tras su introducción en una célula. El uso de vectores virales defectivos permite la administración a las células en un área localizada específica, sin tener que preocuparse de que el vector pueda infectar a otras células. Por tanto, el tejido adiposo puede ser una diana específica. Ejemplos de vectores concretos incluyen, entre otros, vector del virus del herpes 2 defectivo (HSV1) [Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-330 (1991)], vector del virus del herpes defectivo que carece del ge de la glicoproteína L [publicación de patente RD 371005 A], u otros vectores del virus del herpes defectivo [publicación de patente internacional nº WO 20 94/21807, publicada el 29 de septiembre de 1994; shed publicación de patente internacional nº WO 92/05263, publicada el 2 de abril de 1994]; un vector adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. [*J. Clin. Invest.* 90:626-630 (1992); véase también La Salle et al., *Science* 259:988-990 (1993)]; y un vector de virus adenoasociado defectivo [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 la administración in vivo, se emplea un tratamiento inmunosupresor apropiado junto con el vector viral, por ejemplo vector adenovirus, para evitar la inmunodesactivación del vector viral y las células transfeccionadas. Por ejemplo, se pueden administrar citoquinas inmunosupresoras, como la interleuquina 12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ), o anticuerpo anti-CD4, se pueden administrar para bloquear las respuestas humorales o celulares a los vectores virales [véase, p. ej., Wilson, *Nature Medicine* (1995)]. Además, es ventajoso emplear un vector viral que se ha sometido a ingeniería para expresar un número mínimo de antígenos.

En otra realización, el ADN o gen se puede introducir en un vector retroviral, por ejemplo como se describe en Anderson et al., Patente de EE.UU. nº 5,399,346; Mann y col., 1983, *Cell* 33:153; Temin y col., Patente de EE.UU. nº 4,650,764; Temin y col., Patente de EE.UU. nº 4,980,289; Markowitz y col., 1988, *J. Virol.* 62:1120; Temin y col., Patente de EE.UU. nº 5,124,263; publicación de patente internacional nº WO 95/07358, publicado el 16 de marzo de 1995, de Dougherty y col.; y Kuo y col., 1993, *Blood* 82: 845. Los vectores retrovirales se pueden construir para que funcionen como partículas infecciosas o sufran un único ciclo de transfección. En el primer caso, el virus se modifica para que conserve todos sus genes, a excepción de los responsables de las propiedades de transformación oncogénica y que exprese el gen heterólogo. Los vectores virales no infecciosos se preparan para destruir la señal

de empaquetamiento viral, pero conservan los genes estructurales requeridos para empaquetar el virus introducido sometido a ingeniería para que contengan el gen heterólogo y las señales de empaquetamiento. Por tanto, las partículas virales que se producen no son capaces de producir virus adicionales.

5 La liberación génica dirigida se describe en la publicación de patente internacional WO 95/28494 publicada en octubre de 1995.

10 Como alternativa, el vector se puede introducir in vivo mediante lipofección. Durante la última década se ha producido un uso creciente de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos in vitro. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas se pueden usar para preparar liposomas para la transfección in vivo o 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 estimular la encapsulación de ácidos nucleicos con carga negativa y también promueve la fusión con membranas celulares cargadas negativamente [Felgner and Ringold, Science 337:387-388 (1989)]. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos in vivo tiene ciertas ventajas prácticas. Dirigir los liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos celulares concretos sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con el fin de dirigir el tratamiento [véase Mackey, et. al., supra]. Los péptidos dirigidos, por ejemplo hormonas o neurotransmisores, y proteínas, como anticuerpos o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse a los liposomas químicamente.

25 También es posible introducir el vector in vivo como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para terapia génica se pueden introducir en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación en fosfato cálcico, uso de una pistola génica o uso de un transportador de vector de ADN [véase, p.ej., Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-967 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624 (1988); Hartmut et al., solicitud de patente canadiense N° 2,012,311, presentada el 15 de marzo de 1990; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991)]. La liberación de ADN mediada por receptores también se pueden usar [Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)].

35 En una realización preferida de la presente invención, un vector de terapia génica como se ha descrito anteriormente emplea una secuencia de control de la transcripción que comprende la secuencia consenso de ADN reconocida por, por ejemplo, un autoanticuerpo de la invención, es decir, un sitio de unión a anticuerpo, asociado operablemente con un gen heterólogo terapéutico insertado en el vector. Es decir, un vector de expresión específico de la invención se puede usar en terapia génica.

40 La presente invención se entenderá mejor a partir de la consideración de los ejemplos no limitantes siguientes, que describe la preparación de materiales, compuestos y composiciones y el desarrollo y práctica de procedimientos ilustrativos de la presente invención. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar muchas modificaciones, tanto de materiales como de procedimientos, sin desviarse del fin y la intención de la presente divulgación. Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y también sirven para finalizar la tarea de los solicitantes para presentar el mejor modo conocido para la práctica de la invención y, de ningún modo, se interpretará como limitante del amplio alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

50 Los ejemplos siguientes presentan la preparación y análisis de anticuerpos monoclonales y policlonales humanos. En particular, los anticuerpos IgM policlonales humanos se prepararon y analizaron, en los que su capacidad para unirse con afinidad alta a estructuras y células dentro del SNC, por ejemplo, e incluye oligodendrocitos, con una especificidad alta por tejido neural, y se demostró la capacidad concocmitante par potenciar la remielinización. Como se presenta en el presente documento a continuación, la remielinización se verificó en un modelo de desmielinización inducida por el virus de Thelie e inducida por lisolecitina.

Introducción

60 La potenciación de la remielinización es un importante objetivo terapéutico en los trastornos desmielinizantes inflamatorios del SNC, tal como esclerosis múltiple (EM). La identificación de lesiones del SNC extensamente remielinizadas en algunos pacientes que mueren de EM aguda y en los datos recientes de los solicitantes de biopsias cerebrales sugiere que puede ser posible la reparación completa en las primeras etapas de la enfermedad (Prineas and Connell 1979; Prineas, et al 1993; Rodriguez and Scheithauer 1994). No obstante, a medida que la enfermedad progresa, la remielinización se limita y se produce principalmente en la periferia de la lesión. Se han propuesto una serie de razones para que no se consiga alcanzar la remielinización completa en las lesiones de EM (Ludwin 1981). Dos importantes consideraciones incluyen la depleción de células capaces de

remielinizar y la depleción de factores, que sostienen su crecimiento y diferenciación. Por tanto, la intervención precoz para estimular las células de reparación o para eliminar los factores inhibidores que impiden la reparación de la mielina puede ser clave para una estrategia terapéutica.

Se han analizado una serie de enfoques como estrategias terapéuticas para estimular la remielinización en animales experimentales. El trasplante de oligodendrocitos o células gliales progenitoras en lesiones previamente desmielinizadas puede dar como resultado la remielinización de axones del SNC y, en menor medida, la migración de células precursoras de la mielinización. Se ha demostrado que la remielinización central restablece la conducción. Una estrategia alternativa propuesta por los solicitantes es potenciar la remielinización endógena (Miller, D.J. et al. 1995b). Este abordaje implica que las células capaces de remielinizar y los factores que sostienen su crecimiento o diferenciación están presentes en las lesiones desmielinizadas, pero que hay mecanismos que inhiben esta respuesta y, por tanto, previenen la remielinización completa.

Una de las primeras descripciones de la potenciación de la remielinización endógena del SNC procedió del modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Usando coadyuvante incompleto de Freund (IFA) como vehículo y los componentes de la mielina como antígeno, la inmunización tras la inducción de la enfermedad estimuló la recuperación estructural y funcional en cobayas con EAE (Trautgott y col., 1982). En base a la estimulación de la remielinización endógena en EAE se realizaron experimentos similares en ratones infectados crónicamente con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) (Lang, W. et al., 1984). La infección por TMEV de células susceptibles de ratones da lugar a la desmielinización inflamatoria crónica en el contexto de persistencia del virus, que sirve como un excelente modelo de EM. Los ratones infectados crónicamente tratados con homogeneizado de médula espinal (SCH) EN ifa mostró una remielinización sustancial del SNC en comparación con los animales control a los que solo se administró adyuvante. A esta observación le siguió experimentos que demostraron que la transferencia pasiva de antisuero o Ig purificada de animales singéneos no infectados inmunizados con SCH/IFA estimula la remielinización en ratones infectados crónicamente con TMEV. (Rodríguez et al., 1987a; Rodríguez and Lennon 1990; Rodríguez 1991). Estos experimentos eran nuevos y contrastaban con la visión clásica de que la respuesta inmunitaria humoral desempeña un papel patológico en enfermedades desmielinizantes del SNC. Estos experimentos fueron los primeros en demostrar que las IG, en particular los autoanticuerpos, podrían desempeñar un papel beneficioso en la estimulación de la remielinización del SNC.

En base a estas observaciones comenzó la generación de AcMo que estimularon la remielinización del SNC en el modelo de desmielinización de Theiler. Se utilizaron bazos de ratones SJL en los que se había inyectado sch/IFA como fuente de células B para fusión y producción de hibridoma. Previamente se había demostrado que el suero de estos ratones estimulaba la remielinización en ratones crónicamente desmielinizados. Se generaron hibridomas y se seleccionaron mediante ELISA usando SCH como antígeno. Tras la fusión inicial, dos de los 95 hibridomas viables secretaron anticuerpos que se unieron significativamente a SCH. Las células de hibridoma de estos pocillos (denominados SCH79 y SCH94) se subclonaron y seleccionaron según la inmunorreactividad de SCH. En la serie SCH79, 14 de 49 clones fueron positivos y en la serie SCH94 17 de 32 fueron positivos. Los anticuerpos monoclonales producidos por estos hibridomas se analizaron después in vivo por su capacidad para estimular la remielinización en el sistema del modelo de Theiler. Ratones SJL/J de seis a ocho meses de edad infectados crónicamente recibieron inyección intraperitoneal o intravenosa de AcMo dos veces a la semana durante 4-5 semanas con una dosis de mAb total de 0,5 mg a 5,0 mg. Dos AcMo SCH94.03 and SCH94.32, mostraron la mayor potenciación de la remielinización del SNC (Miller et al., 1994). La secuencia de las cadenas ligeras SCH94.03 probó que estos dos anticuerpos eran idénticos, por lo que más tarde se denominaron SCH94.03 (Miller and Rodríguez 1995c).

El tratamiento con SCH94.03 de ratones SJL con desmielinización crónica inducida por TMEV en general tiene como resultado 20-30 % de remielinización del área desmielinizada total, en comparación con menos del 5% en animales control tratados con PBS. Esto representa un incremento de 4-6 veces de la remielinización frente a los controles y, a partir de los recuentos axonales, se ha estimado que esto representa una media de 100.000 axones remielinizados en animales tratados con SCH94.03. El análisis por microscopía electrónica de las lesiones completamente remielinizadas revela ninguna zona no remielinizada, lo que sugiere que la remielinización de los axones disponibles en estas lesiones es cercana al 100 %. SCH94.03 pertenece a la subclase de IgM y es altamente polirreactivo contra antígenos proteicos conocidos y desconocidos, incluidas las proteínas del citoesqueleto. De interés es que está codificado por los genes de la línea germinal de Ig no mutada, lo que confirma que SCH94.03 es un anticuerpo natural. De importancia es que SCH94.03 reconoce un antígeno de superficie sin identificar sobre los oligodendrocitos, lo que proporciona una potencial diana para los mecanismos de acción de este anticuerpo.

Central para esta hipótesis son las diferencias en la biología entre SCH94.03 y CH12. En el momento de la identificación de la secuencia génica de Ig de SCH94.03 se descubrió que había otro anticuerpo IgM de ratón con una secuencia de la línea germinal idéntica y una combinación génica. Este anticuerpo IgM, designado CH12, es de un linfoma de células B cd5+ y tiene una especificidad aparente fosfatidililina. SCH94.03 y CH12 tienen una identidad de aminoácidos del 99,1 % en la región VL y tienen secuencias de VH idénticas. Las únicas diferencias entre SCH94.03 and CH12 se encuentran en la región CDR3, debido a las inserciones en la región N. CH12 no marca la superficie de los oligodendrocitos y no estimula la remielinización en el sistema del modelo de Theiler, por lo que

establecer que la única diferencia molecular que justifique el mecanismo de estimulación de la remielinización reside dentro de la región CDR3. Esta conclusión avala la hipótesis de que la unión de estos AcMo a antígenos específicos, probablemente dentro de la lesión desmielinizada, es importante para la inducción de la remielinización.

Hasta la fecha se han identificado seis anticuerpos monoclonales diferentes de ratón, que estimulan la remielinización en el modelo de TMEV para enfermedades desmielinizantes (Asakura et al., 1998). Los seis anticuerpos son del isotipo de IgM y conservan las secuencias de la línea germinal que son reminiscentes de los autoanticuerpos (Miller and Rodríguez 1995; Asakura et al., 1996). Cada uno muestra una especificidad de unión a antígeno amplia, pero, lo más importante, cada uno se une a los antígenos expresados en las superficies de los oligodendrocitos. Los estudios realizados hasta ahora con anticuerpos IgM que no se unieron a los oligodendrocitos no estimularon la remielinización. El miembro prototípico de este grupo, AcMo SCH94.03, se ha demostrado que estimula la remielinización en varios modelos de ratón para enfermedades desmielinizantes. En ratones con desmielinización crónica inducida por virus (TMEV), el tratamiento con SCH94.03 tiene como resultado un incremento de 4-6 veces de la remielinización. El tratamiento con SCH94.03 también se ha mostrado que incrementa significativamente la tasa de remielinización espontánea que se produce tras la desmielinización químicamente inducida tras la inyección de lisolecitina.

Dado el éxito del aislamiento y caracterización de los anticuerpos de ratón que estimulan la remielinización, la identificación de homólogos humanos de los monoclonales de ratón comenzó usando una estrategia independiente de antígeno. La justificación era identificar anticuerpos humanos que reaccionan con el homogeneizado de médula espinal de ratón mediante ensayo ELISA y que se unen con una afinidad alta a las estructuras y células dentro del SNC. Estos anticuerpos se analizaron después en los modelos de desmielinización de ratón por su capacidad para estimular la reparación de la mielina. Los sueros combinados de IgG e IgM humanas de pacientes de la clínica Mayo Hematology y los anticuerpos monoclonales de células B humanas inmortalizadas con EBV (de varias fuentes, como se describe en los resultados) se caracterizaron y analizaron en los modelos de ratón. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación.

RESULTADOS

IgM policlonal humana, pero no IgG, se une a láminas cerebrales de rata y a oligodendrocitos en cultivo

Mediante inmunohistoquímica, la IgM humana policlonal tiñe la superficie de una subpoblación de oligodendrocitos (Figura 6) y es altamente reactiva para las estructuras y células en una lámina de cerebro de rata (Figura 1B). Con la IgG policlonal humana no se observó reactividad frente a los antígenos de superficie de los oligodendrocitos (Figura 6) o a las láminas de cerebro de rata (Figura 1A). La inmunohistoquímica usando IgM o IgG policlonal humana sobre células gliales fijadas y permeabilizadas mostró una tinción mínima de las estructuras intracelulares (datos no mostrados).

La especificidad de la IgM policlonal humana por las estructuras y células del SNC, y la unión a los oligodendrocitos pueden dirigir el pronunciado potencial remielinizante. En contraste con ello, la IgG policlonal humana, aunque estimula la remielinización sobre los niveles control (véase la Tabla 1), no se une al SNC y puede funcionar a través de un mecanismo diferente al de la IgM policlonal humana.

IgG e IgM policlonales humanas estimulan la remielinización del SNC en ratones infectados por TMEV

Aunque la causa de la EM se desconoce, en estudios epidemiológicos se ha sugerido que la enfermedad puede estar desencadenada por un agente infeccioso (Franklin y col., 1991), aunque esta teoría no se ha probado con ninguna prueba concluyente. Más recientemente, el virus del herpes de tipo 6 ha recibido atención como posible agente etiológico en una subpoblación de pacientes (Groves y col., 1993). De los múltiples factores epidemiológicos estudiados que correlacionan con las exacerbaciones, solo se ha efectuado una asociación consistente con una infección vírica reciente (Smith y col., 1981). Además, el principal tratamiento establecido para la EM, IFN- β , es una citoquina crucial para el control de la replicación del virus (14).

Un importante modelo murino para el estudio de la EM es el virus de la encefalomiелitis murino de Thelie (TMEV). Este picornavirus de cadena positiva tiene una serie de ventajas. (1) El virus es un patógeno natural de los ratones, una especie de la que se sabe mucho sobre inmunología y genética; (2) la desmielinización primaria (destrucción de las vainas de mielina) es la manifestación física principal de la infección crónica (Trautgott y coll., 1982); (3) la genética del huésped desempeña un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad o resistencia a la persistencia crónica del virus, desmielinización y enfermedad neurológica (Lang y coll., 1996; Rodríguez y col., 1987a, 1987b); (4) como en la EM, la patología está mediada por el sistema inmunitario (Rodríguez y Lennon, 1990; Rodríguez 1991; Miller y col., 1994; Miller y Rodríguez 1995c); (5) existe información completa sobre la virología molecular, incluidos detalles de la replicación del virus y del ensamblaje del virus; (6) la mayoría de los ratones susceptibles que alojan la infección por TMEV crónica desarrollan enfermedad neurológica similar a la EM: debilidad de las extremidades, espasticidad, incontinencia, disminución de la actividad espontánea y, en última instancia, parálisis (Asakura y col., 1996a; Asakura y col., 1998).

De un modo similar a la EM, los ratones infectados por TMEV mostraron un amplio espectro de fenotipos de enfermedades (definidos como desmielinización y déficit neurológicos) (Ludwin, 1997). En un extremo están los 45 animales en los que el virus se replica rápidamente en las neuronas del SNC, no es eliminado por el sistema inmunológico y tiene como resultado encefalitis grave y muerte (Asakura y col., 1996). Este patrón de patología se observa en ratones neonatos o ratones con inmunodeficiencia grave. Esta enfermedad fulminante contrasta con los ratones que montan una respuesta inmunitaria protectora, mediada principalmente por los linfocitos T de restricción de clase I, que eliminan el virus del SNC. Estos animales desarrollan encefalitis aguda, tras lo cual el virus se elimina del SNC sin la consiguiente desmielinización (Blakemore y col., 1997; Jeffrey y Blakemore 1995). Entre estos dos extremos se encuentran los animales que desarrollan enfermedad aguda que se resuelve, pero entran en una fase crónica que se caracteriza por desmielinización progresiva y persistencia del virus en oligodendrocitos, astrocitos y microglía (Rivera-Quinones y col., 1998; Miller y col., 1995a). Aunque estos ratones montan una respuesta inmunitaria que impide la muerte y la encefalitis devastadora, la incapacidad para eliminar el virus de la sustancia blanca tiene como resultado una inflamación persistente crónica y desmielinización mediada por el sistema inmunitario. Para evitar las respuestas inmunitarias anti-humano, se trató a los ratones crónicamente infectados (de 5 a 6 meses después de la infección por TMEV) con una única inyección en bolo de 1 mg de Ig por vía intraperitoneal. La dosis total de Ig fue de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal, que corresponde a un octavo de la dosis total usada para el tratamiento con IVIg humana. No se produjeron diferencias significativas en las áreas de patología de la mielina entre los grupos de tratamiento (Tabla 1). No obstante, los ratones tratados con IgM policlonal humana mostraron una remielinización importante. Aproximadamente un cuarto del área total de la patología de mielina se reparó en ratones tratados con IgM policlonal humana. La extensión de la remielinización fue significativamente mayor que la remielinización espontánea observada en los grupos control tratados con PBS ($p < 0,01$), pero también fue superior a la observada en los ratones tratados con IgG policlonal humana ($p = 0,05$). Los ratones tratados con IgG policlonal humana mostraron más remielinización que los ratones tratados con PBS. Las lesiones individuales que se remielinizaron mostraron una reparación casi completa con pocas células inflamatorias o macrófagos (Figura 12A, B). Con frecuencia, en cada lesión de este tipo se observaron de 500 a 1000 axones remielinizados. En contraste, la mayoría de las lesiones en ratones tratados con PBS tenían menos exones remielinizados y las lesiones contenían muchas células inflamatorias y macrófagos, signos de destrucción activa de la mielina.

La IgM policlonal humana potencia la remielinización en la desmielinización inducida por lisolecitina

La inyección de lisolecitina en la médula espinal es un procedimiento bien establecido para la lesión y desmielinización de la médula espinal químicamente inducidas. La inyección tiene como resultado lesiones desmielinizadas reproducibles que sufren remielinización espontánea a las 5-6 semanas. Trabajos previos realizados por los presentes solicitantes han mostrado que el tratamiento con anticuerpos que estimulan la remielinización incrementa la tasa de remielinización endógena de modo que las lesiones están sustancialmente reparadas a las 3 semanas. La naturaleza monofásica de las lesiones por lisolecitina, su rápida reparación espontánea y la ausencia de déficit clínicos en los animales lesionados contrastan con la desmielinización crónica inducida por TMEV y puede modelar aspectos de la lesión en la médula espinal mejor que la EM.

Los animales con lesiones en la médula espinal inducidas con lisolecitina fueron tratados con IgM e IgG policlonal humana. Las microfotografías de las áreas de lesión mostraron que los animales que recibieron IgM policlonal humana contenían muchos axones remielinizados, mientras que los animales tratados con IgG policlonal humana o PBS contenían pocos axones remielinizados (datos no mostrados). En un esfuerzo para cuantificar el número de axones remielinizados por área de lesión, con un aumento alto se contaron los axones remielinizados de las lesiones de los 3 grupos de tratamiento. Había un número significativamente mayor de axones mielinizados en lesiones de lisolecitina tratadas con IgM policlonal humana que los animales tratados con IgG policlonal humana ($p < 0,05$).

Las inmunoglobulinas policlonales humanas reaccionan con múltiples autoantígenos y haptenos químicos

Las especificidades por antígeno de las Ig usadas en este estudio se analizaron mediante ELISA. En estudios previos se ha indicado que los anticuerpos que estimulan la remielinización muestran una reactividad amplia a múltiples antígenos proteicos y de haptenos (Miller y col., 1995c). Tanto la IgG como la IgM policlonal humana se unieron a múltiples antígenos proteicos y haptenos químicos (Figuras 15 y 16).

La IgG y la IgM policlonales humanas no reaccionan con antígenos de TMEV.

Para excluir la posibilidad de que la remielinización potenciada por IgM humana combinada era el resultado de la especificidad por antígenos de TMEV se realizó transferencia de tipo Western usando TMEV purificado. Ninguno de los AcMo usados en este estudio reaccionó con ninguna de las proteínas de la cápside del TMEV conocidas (datos no mostrados). En contraste con ello, los anticuerpos policlonales de conejo producidos contra TMEV mostraron una fuerte reactividad frente a los antígenos de la cápside VP1, VP2, VP3 del virus.

Los anticuerpos monoclonales reactivos en el SNC se pueden identificar en suero humano.

Dado que los autoanticuerpos naturales existen en la población humana normal, debería ser posible identificar autoanticuerpos monoclonales naturales humanos mediante detección selectiva de un gran número de clones de IgM monoclonal humana. Se diseñó una detección selectiva inicial de polirreactividad de anticuerpos monoclonales humanos derivados de suero usando un sistema de ensayo de unión a láminas de cerebro sin fijar. Los clones positivos son las muestras que se unieron a estructuras específicas del cerebro o a capas anatómicas o a poblaciones celulares significativamente por encima del nivel de fondo de un anticuerpo secundario conjugado con un marcador fluorescente solo.

En cincuenta y dos muestras de IgM humana, purificada de los sueros de los pacientes benidos del departamento de hematología de la clínica Mayo, bajo la dirección del Dr. Robert A Kyle, se analizó la especificidad del SNC en un ensayo de unión a láminas de cerebro. Se determinó que treinta y dos anticuerpos se unían por encima del nivel de fondo. En las Figuras 1 y 2 se presentan varias de las reactividades. También se analizaron cincuenta IgG derivadas de suero humano según su especificidad del SNC en un ensayo de unión a láminas de cerebro y se se identificaron patrones de unión distintos por encima del nivel de fondo (datos no mostrados). Por tanto, inmediatamente se identificó una diferencia grande entre las IgM y las IgG monoclonales humanas.

Los 32 anticuerpos positivos se analizaron después en función de la unión a través de un sistema de ELISA con homogeneizado de médula espinal (Figura 10) y de la unión a cultivos de células gliales primarias mixtos de rata tanto fijadas como vivas (Figure 7). Una tabulación de las reactividades de dichos anticuerpos (anticuerpos sHlgm #) se muestra en la Tabla 2. Los criterios para analizar un anticuerpo para actividad biológica in vivo fueron la especificidad del SNC, la unión a oligodendrocitos no fijados en cultivo y una reactividad significativa frente al SCH mediante ELISA. Por tanto, se identificó a sHlgM 22 y a sHlgM46 como estimuladores de la remielinización. Otros varios candidatos a sHlgM quedan por estudiar cuidadosamente. La capacidad de los anticuerpos sHlgM analizados para unirse a los oligodendrocitos se muestra en la Tabla 3.

Los anticuerpos monoclonales reactivos al SNC se identificaron a partir del sobrenadante de los clones de células B humanas inmortalizadas con EBV.

Los sobrenadantes de clones celulares que tenían una concentración total de IgM superior a 3 ug/ml se analizaron en un sistema de ensayo de láminas de cerebro para determinar su capacidad para unirse a las estructuras del SNC. Se analizaron ciento cuarenta sobrenadantes de clones según la unión a las láminas de cerebro. Se determinó que quince anticuerpos se unían por encima del nivel de fondo. En la Tabla 2 se muestra una tabulación de las reactividades de estos anticuerpos (MSI N°). En las Figuras 4 y 5 se presenta una representación de las reactividades de ebvHlgM. Se analizó la capacidad de estos anticuerpos para unirse a los oligodendrocitos. Estos resultados se muestran en la tabla 3.

sHlgMs se unen a la sustancia blanca cortical humana.

Para confirmar que los sHlgM se unen al SNC humano, la sustancia blanca cortical humana se inmunomarcó en un sistema análogo al ensayo con láminas de cerebro de rata. La Figura 3 presenta varias de las especificidades del SNC de los sHlgM. Cuatro anticuerpos se unen bien al SNC humano (Figura 3B,C,D,E), mientras que la Figura 3A muestra un sHlgM que se une ligeramente por encima del nivel de fondo.

Los anticuerpos monoclonales humanos se unen a los antígenos de superficie sobre las células en cultivos mixtos de células gliales primarias.

Varios de los sHlgM se unen a las células en cultivos mixtos de células gliales primarias de rata. sHlgM 12 se une a los supuestos grupos de progenitores de oligodendrocitos (Figura 7A) en un campo de oligodendrocitos positivos para O4. Otros cuatro sHlgM (Figuras 7B,C,D,F) se unen a los oligodendrocitos morfológicamente maduros. sHlgM 30 se une a la mayoría de las células (oligodendrocitos, astrocitos, microglía) en el cultivo (Figura 7E).

sHlgM y ebvHlgM estimulan la remielinización del SNC en ratones infectados por TMEV.

Para evitar las respuestas inmunitarias anti-humano, se trató a los ratones crónicamente infectados (de 5 a 6 meses después de la infección por TMEV) con una única inyección en bolo de 0,5 mg del anticuerpo monoclonal humano por vía intraperitoneal. De los anticuerpos monoclonales humanos analizados in vivo hasta la fecha, sHlgM 22, sHlgM46 and ebvHlgM MSI19D10 estimulaban significativamente la remielinización sobre otras IgM monoclonales humanas analizadas (sHlgM 1,2 y 14). No se produjeron diferencias en las áreas de patología de la mielina entre los grupos de tratamiento (Tabla 1). Los ratones tratados con sHlgM 22 y sHlgM46 mostraron una remielinización importante. Aproximadamente un quinto del área total de la patología de mielina se reparó en ratones tratados con sHlgM 22 (Tabla 1). La extensión de la remielinización fue significativamente superior que la remielinización espontánea observada en los grupos control tratados con PBS ($p < 0,05$, Tabla 1). Las lesiones individuales remielinizadas mostraron una reparación casi completa con pocas células inflamatorias o macrófagos

(Figura 12). Con frecuencia, en cada lesión de este tipo se observaron de 500 a 1000 axones remielinizados. En contraste, la mayoría de las lesiones en ratones tratados con PBS tenían menos exones remielinizados y las lesiones contenían muchas células inflamatorias y macrófagos, signos de destrucción activa de la mielina. Consistente con los trabajos previos que demostraban que los anticuerpos mononoclonales de ratón reactivos con los oligodendrocitos pueden estimular la remielinización in vivo (Asukara y col., 1998), los anticuerpos humanos reactivos con los oligodendrocitos con reactividades similares a las de sus homólogos de ratón pueden estimular la remielinización in vivo también.

Tabla 1. Remielinización del SNC por anticuerpos humanos

Tratamiento	Nº de ratones	Área de sustancia blanca (mm ²)	Área de patología de la mielina (mm ²)	Área de remielinización de tipo SNC (mm ²)	Área de remielinización de tipo SNC (%)
policlonal IgG humana	10	8,6 ± 0,52	0,86 ± 0,10	0,13 ± 0,02	14,15 ± 2,38*
policlonal IgM humana	13	9,70 ± 0,43	1,21 ± 0,21	0,24 ± 0,04	23,2 ± 3,26**
sHlgM 1	4	9,34 ± 1,93	0,68 ± 0,07	0,03 ± 0,01	8,35 ± 3,73
sHlgM 2	4	8,78 ± 0,70	0,87 ± 0,12	0,09 ± 0,01	11,37 ± 1,30
sHlgM 14	7	10,68 ± 0,24	0,98 ± 0,09	0,08 ± 0,03	8,57 ± 2,51
sHlgM 22	8	10,55 ± 0,41	1,16 ± 0,22	0,19 ± 0,05	17,06 ± 3,42*
sHlgM 46	5	9,44 ± 0,36	0,66 ± 0,06	0,18 ± 0,04	27,12 ± 4,01***
ebvHlgM MSI19D10	3	8,24 ± 0,40	0,90 ± 0,14	0,26 ± 0,07	26,47 ± 3,71***
ebvHlgM AKJR4	4	8,70 ± 0,84	1,10 ± 0,15	0,05 ± 0,03	4,15 ± 1,98
PBS	7	9,78 ± 0,60	1,20 ± 0,22	0,06 ± 0,02	6,74 ± 1,80

Los valores representan la media ± SEM. Se usaron ANOVA de una vía y una prueba t para comparar el porcentaje de área de remielinización de tipo SNC en ratones tratados con anticuerpos humanos con los ratones tratados con PBS. Dicho análisis reveló valores *p<0,05; †p<0,01, ‡p<0,001. La comparación de los ratones tratados con IgG policlonal humana con otros tratamientos reveló: IgM policlonal humana p= 0,05, sHlgM 46 P<0,05. Ninguna de las demás comparaciones fue estadísticamente significativa. No se observaron diferencias en la remielinización de tipo SNC entre IgM policlonal humana, sHlgM 22 y sHlgM 46. El área de remielinización de células de Schwann de tipo PNS varió de 0 a 0,08 mm². Esto correspondió a un porcentaje de área de 0,0 a 6,92 de remielinización de células de Schwann de tipo PNS como una función de la patología de la mielina. No se observaron diferencias significativas en el área de la patología de la mielina en los diversos grupos de tratamiento o en comparación con el PBS o en la remielinización de células de Schwann de tipo PNS entre grupos.

TABLA 2

NOMBRE DEL CLON*	DESCRIPCIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOFUORESCENTE DE CEREBELO DE RATA NEONATA
CB2b-G8	Identifica cuerpos celulares neuronales grandes en la capa granular, cuerpos celulares redondos pequeños en la capa molecular, astrocitos fibrosos en la sustancia blanca central.
CB2e-C2	Marcaje débil de cuerpos de células de Purkinje; células pequeñas procesadas de morfología de oligodendrocitos y microglías, y astrocitos en la sustancia blanca central y la capa granular.
CB2i-E7	Marcaje de las células de Purkinje, células en la capa granular, sustancia blanca central en las hojas; citoesqueleto de oligodendrocitos y células gliales.
CB2i-E12	Fuerte marcaje de los cuerpos de las células de Purkinje, árboles dendríticos y células redondas pequeñas en la capa molecular, marcaje casi confluyente de la capa granular, astrocitos fibrosos en la sustancia blanca central.

(continuación)

5	NOMBRE DEL CLON*	DESCRIPCIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOFLUORESCENTE DE CEREBELO DE RATA NEONATA
10	CB2i-G2	Fuerte marcaje de los astrocitos fibrosos en los tractos de la sustancia blanca central; indentifica cuerpos de las células de Purkinje; marcaje puntuado sobre la capa granular, cuerpos de células pequeñas en la capa molecular.
15	CB2L-H1	Fuerte marcaje de los cuerpos de las células gliales en la sustancia blanca central y los cuerpos de células de Purkinje; marcaje más débil de los árboles dendríticos; cuerpos de células pequeñas muy pronunciados en la capa molecular.
20	MSI 10-E10	Fuerte marcaje de los tractos de la sustancia blanca central fibrosos, similar al observado usando anticuerpos antiglicolípicos y anticuerpos anti-microglía.
25	MSI 16-E6	Marcaje fuerte de cuerpos de células de Purkinje, más débil de los árboles dendríticos; marcaje casi confluyente de las células pequeñas en la capa granular; sustancia blanca central casi sin marcar.
30	MSI 17-A2	Marcaje fuerte de células redondas pequeñas en la capa molecular y de cuerpos de células de Purkinje; marcaje difuso de la capa granular, sustancia blanca central sin marcar.
35	MSI 19-C11	Aspecto fibrosos de la sustancia blanca central, con muchas células de la morfología de los oligodendrocitos, marcaje puntuado en la superficie sobre la mayoría del tejido, pero concentrado sobre los presuntos cuerpos celulares.
40	MSI 19-ES	Marcaje de la capa molecular similar a la matriz extracelular, fuerte marcaje fibroso de la sustancia blanca central, que identifica muchas células gliales individuales.
45	AKJR4	Identifica todos los cuerpos celulares neuronales en la capa granular, cuerpos celulares redondos pequeños en la sustancia blanca central y en la capa molecular.
50	MSI 19D10	Se une fuertemente a las células de la capa granular y a las células de Purkinje y a sus árboles dendríticos, además de identificar débilmente la sustancia blanca y los astrocitos.
55	MSI 20H10	Se une a la sustancia blanca central, a la capa granular y molecular, y a las células de Purkinje, con varios grados de intensidad.
60	MSI 17E11	Se une de un modo puntuado a sólo unas pocas células de aspecto glial en la superficie de la lámina de cerebro.
65	sHlgM1	Se une al citoesqueleto de los astrocitos sobre la sustancia blanca central de las hojas.
	sHlgM2	Se une a las células de la capa granular y a las fibras que atraviesan la sustancia blanca central de las hojas.
	sHlgM12	Se une para dar un aspecto esponjoso a la sustancia blanca central de las hojas y un marcaje uniforme sobre la capa molecular, reminiscente de una molécula de la matriz extracelular.
	sHlgM14	Se une bien a las células de la capa granular y a las células de Purkinje localizadas en la superficie de la lámina, mientras que la sustancia blanca central de las hojas está en gran medida desprovista de marcaje.
	sHlgM22	Se une bien al citoesqueleto de los astrocitos dañados sobre la sustancia blanca central de las hojas, a las células de Purkinje y a sus arborizaciones dendríticas, y a las células redondas pequeñas en la capa molecular; marca débilmente la superficie de las células granulares.
	sHlgM26	Se une a las células de aspecto de oligodendrocito y a la sustancia blanca fibrosa.

(continuación)

NOMBRE DEL CLON*	DESCRIPCIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOFUORESCENTE DE CEREBELO DE RATA NEONATA
sHIgM29	Se une débilmente a muchas estructuras dentro del cerebelo, con una intensidad justo por encima de la de fondo, a excepción de una población pequeña de neuronas en las capas granular y molecular. Las extensiones axónicas superiores a 100 µm están claramente delimitadas.
sHIgM30	No se une al cerebelo sin fijar.
sHIgM31	Se une predominantemente a la capa granular, con poca unión a la sustancia blanca, las células de Purkinje o los astrocitos.
sHIgM32	Se une a las células de aspecto de astrocito de tipo 2.
sHIgM42	Se une en un patrón fibroso a toda la hija, las capas molecular y granular y a la sustancia blanca.
sHIgM46	Se une en un patrón fibroso a toda la hija, la capa granular y a la sustancia blanca. Las células de Purkinje están bien definidas.
sHIgM50	Se une predominantemente a la capa granular, con poca unión a la sustancia blanca, las células de Purkinje o los astrocitos.
sHIgM51	Se une a células pequeñas similares a la microglía en las capas molecular y granular.
De los 96 clones de células B humanas de EBV generados, 60 produjeron anticuerpo IgM a una concentración de 2 µg/ml o mayor. De estos, se descubrió que 11 se unían fuertemente al cerebelo murino de forma consistente. Otros 10 se unieron al cerebelo murino débilmente o de forma inconsistente, mientras que 39 no se unieron. Se incluyen las imágenes de la tinción inmunofluorescente de los anticuerpos de tinción fuerte de forma consistente indicados anteriormente, así como cuatro clones negativos representativos (CB2g-E10, CB2g-F11, CB2IF10, MSI24-D6). *CB: Clones generados a partir de sangre de cordón umbilical humano; MSI: clones generados a partir de sangre periférica de pacientes de esclerosis múltiple; AKJR: clones generados a partir de sangre periférica de pacientes de artritis reumatoide.	

TABLA 3

Unión a oligodendrocitos	
Anticuerpo	Unión a oligodendrocitos
MSI 17 A.2	Negativa
MSI 19C11	Negativa
MSI 19E5	Mara oligodendrocitos de morfología madura
AKJR 4	Negativa
MSI 19010	Marca algunos oligodendrocitos de morfología madura
MSI 20H10	No analizado
MSI 17E11	No analizado
SH1gm 1	Sin reactividad contra los antígenos de superficie
SH1gm 2	Sin reactividad contra los antígenos de superficie
SH1gm 12	Presuntos progenitores de oligodendrocitos antes de la expresión de sulfátido
SH1gm 14	Marca oligodendrocitos maduros multiprocesados
SH1gm 22	Marca estadios maduros de los oligodendrocitos y extensiones del proceso

(continuación)

Unión a oligodendrocitos		
Anticuerpo	Unión a oligodendrocitos	
SH1gm 26	Sin reactividad contra los antígenos de superficie	
SH1gm 29	Sin reactividad contra los antígenos de superficie	
SH1gm 30	Sin reactividad contra los antígenos de superficie	
poly hlgG	Negativo en la superficie	
poly hlgm	Subpoblación de oligodendrocitos maduros	
CB2b G8	Marca oligodendrocitos (humanos) de morfología madura	
CB2e C2	Negativa	
CB2iE7	Marca oligodendrocitos de morfología madura	
CB2i E12	Negativa	
CB2i G2	Negativa	
CB2L H1	Negativa	
MSI 10E10	Negativa	
MSI 16E6	Negativa	
sHlgM31	No hay unión a oligodendrocitos	
sHlgM32	No hay unión a oligodendrocitos	
sHlgM42	Se une a los estadios maduros de los oligodendrocitos y débilmente a los astrocitos subyacentes	
sHlgM46	Se une fuertemente a los estadios maduros e inmaduros de los oligodendrocitos con marcaje puntuado.	
sHlgM50	Débil marcaje puntuado de la subpoblación de estadios maduros de los oligodendrocitos	
sHlgM51	Se une a los estadios maduros de los oligodendrocitos y débilmente a los astrocitos subyacentes.	

Anticuerpos monoclonales que estimulan la remielinización producen un flujo de Ca^{2+} en las células gliales en cultivo.

La respuesta de las células gliales cultivadas a las concentraciones fisiológicas de los anticuerpos que estimulan la remielinización sugiere que estos anticuerpos pueden tener efectos directos sobre la bioquímica de las células gliales a través de la regulación del flujo de calcio celular. Este efecto puede representar un aspecto importante del mecanismo molecular de la remielinización inducida por anticuerpos. La Figura 21 demuestra las respuestas de Ca^{2+} de las células gliales a cuatro anticuerpos diferentes. Dos de estos anticuerpos, sHlgM 22 y SCH94.03, estimulan la remielinización in vivo y dos sHlgM 14 y CH12 no estimulan la remielinización. Las células que respondieron al anticuerpos exhibieron uno de dos tipos diferentes de picos de calcio. Algunas células respondieron con un pico de inicio rápido de corta duración (respuesta rápida), como muestran los trazados rojos en los paneles A y B. Una subpoblación distinta de células respondió con un pico de inicio más lento de duración más larga (respuesta lenta) como demuestra la ausencia de trazados negros en los paneles A y B. Los anticuerpos sHlgM 22 y SCH94.03 provocaron cada uno ambos tipos de respuestas, pero siempre de diferentes células gliales individuales. Estas respuestas cualitativamente diferentes sugieren claramente dos modos de acción moleculares distintos sobre diferentes subpoblaciones de células. Una respuesta de anticuerpo (la respuesta rápida o la lenta) se observó en 30 de 251 células tras el tratamiento con sHMab22 y en 36 de 251 células tratadas con SCH 94.03. Los anticuerpos que no estimulan la remielinización in vivo (sHlgM14 y CH12) no se observó que causaran el flujo de calcio en cultivos de glía (panel C). Para cada uno de estos anticuerpos se analizó un total de 203 células.

Los anticuerpos monoclonales humanos se unen a las neuronas primarias.

Muchos de los sHlgMs y ebvHlgMs se unen a poblaciones neuronales en láminas de cerebro. No obstante muchas de las aneuronas unidas están en la superficie de la lámina, lo que plantea la posibilidad de que los anticuerpos se puedan unir a epítomos internos dentro de las neuronas dañadas. Las Higo de unión positivas se analizaron para determinar la unión a células granulares de rata viva en cultivo. La Figura 22 demuestra la unión de dos sHlgMs a neuronas vivas. sHlgM 12 se une a las extensiones axonales y dendríticas de las neuronas (Fig. 22A), mientras que ebvHlgm CB2iE12 se une exclusivamente al exterior de la membrana de las células granulares y las extensiones axónicas proximales (Figura 22B). Estas reactividades se verificaron mediante inmunohistoquímica de marcaje doble mediante marcaje c de neuronas ositivas a anticuerpos humanos con anticuerpos de proteína 2 asociados anti-neurofilamento y anti-microtúbulos (datos no mostrados).

De interés particular para nuestro laboratorio es la posibilidad de que la desmielinización predisponga a los axones a lesiones inmunomediadas y a los correspondientes déficit neurológicos. En nuestro análisis reciente de ratones deficientes en microglobulina p2 ($\beta 2m^{-/-}$), los inventores demostraron que, en ausencia de MHC de clase I, los ratones infectados con TMEV desarrollan lesiones de desmielinización grandes pero no desarrollan déficits clínicos. Los ratone smostaron una conservación relativa de axones con mayores densidades de los canales de calcio y remielinización de la sustancia blanca de la médula espinal. La conservación de los exones parece ser esencial para el mantenimiento de la función neurológica. La observación de que los anticuerpos humanos se pueden unir específicamente a las neuronas presenta otra posible vía para la participación de los anticuerpos en la reparación del SNC. Ciertos anticuerpos pueden ser capaces de potenciar la remielinización a través de su acción sobre las neuronas. La reparación de las lesiones en el SNC se pueden potenciar con anticuerpos monoclonales a través de muchas situaciones posibles. 1) incrementar las uniones adhesivas entre neuronas y oligodendrocitos. 2) estimulación celular directa de las neuronas ara regular por incremento los factores tróficos y atraer a los 20 progenitores de los oligodendrocitos al área de los axones desnudos. 3) neuroprotección de los axones mediante bloqueo de los canales iónicos con pérdidas sobre los axones desnudos. 4) protección de los axones desnudos del reconocimiento por las células inmunitarias activadas y destructoras.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

A. Producción de anticuerpos monoclonales, caracterización, detección selectiva y purificación:

Fuentes de Ac y purificación de Ac.

IgM humana normal se purificó de plasma combinado de más de 2.500 donantes sanos mediante el procedimiento de fraccionamiento en etanol de Deutsch-Kistler-Nitschmann, seguido de precipitación en ácido octanoico y dos etapas sucesivas de cromatografía de intercambio iónico como previamente se ha descrito (Hurez y col., 1997). La pureza de la IgM fue superior al 90 %, confirmado mediante ELISA y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). La IgG humana combinada de donantes sanos usada clínicamente como IVIg se adquirió en Miles Inc. (Elkhart, IN). Las muestras se obtuvieron de la clínica de disproteinasa bajo la dirección del Dr. Robert A. Kyle, Clínica Mayo. Las muestras de suero procedieron de pacientes con una amplia variedad de afecciones caracterizadas por picos de IgG o IgM monoclonales en suero, incluidas macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma, gammapatía monoclonal benigna.

Generación de líneas de células B inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr (EBV)

La línea celular de tití B95-8 de la ATCC (Nº CRL 1612) para el crecimiento y aislamiento del EBV. Las células se siembran a 1×10^6 células/ml en medio completo RPMI-10, seguido de 3 días de incubación en un incubador humidificado, a 37 °C, 5% de CO₂. Las células se recogen y el sobrenadante se elimina mediante centrifugación durante 10 minutos a 300 x g y a 4 °C. El sobrenadante que contiene el EBV se pasa a través de un filtro de 0,45 40 µm y el flujo pasante se recoge y almacena a -130 °C (nitrógeno líquido). Este sobrenadante con EBV contiene, en general, 102-103 unidades transformantes/ml.

Las células B periféricas para inmortalización se recogieron de la sangre de adultos normales (NA), adultos con artritis reumatoide (AKJR), adultos con esclerosis múltiple (EM) y de sangre de cordón umbilical (CB). La sangre heparinizada (15 ml) se diluye a 1:2 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 12 ml de esta dilución se introducen por debajo de la capa con 12 ml de Ficoll-Hypaque en un tubo de centrifuga de 50 ml. El tubo se centrifuga durante 8 minutos a 1500 x g, a temperatura ambiente, y la interfaz leucocitaria se elimina y se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga de 50 ml. Las células se lavan mediante centrifugación (15 minutos, 300 x g, temperatura ambiente), una vez en PBS y, después, dos veces en solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Después, las células se resuspenden en 2-5 ml de medio completo RPMI-10 y se contaron.

Las células se diluyen a 4×10^6 células/ml en medio completo RPMI-10, 2,5 ml (1×10^7 células) se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml y se añaden 2,5 ml de sobrenadante con EBV. El tubo se incuba durante dos horas en un baño de agua a 37 °C, seguido de la adición de 5 ml de medio completo RPMI-10 que contiene 1 µg/ml de ciclosporina A. Los 10 ml de suspensión celular se transfieren después a un matraz de cultivo tisular de 25 cm² y se cultivan durante 3 semanas en un incubador humidificado, a 37 °C, 5% de CO₂. Tras 3 semanas, un

alícuota del cultivo se crioconserva y el resto se expande y se aíslan las líneas de células clonales mediante dilución límite.

Purificación de anticuerpos IgM

Se escogieron muestras de suero humano para estudiar únicamente por la presencia de un pico alto de IgM en el cromatograma de Ig. Las muestras se obtuvieron de la clínica de disproteinasa bajo la dirección del Dr. Robert A. Kyle, Clínica Mayo. Las muestras de suero procedieron de pacientes con una amplia variedad de afecciones caracterizadas por picos de IgG o IgM monoclonales en suero, incluidas macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma, gammapatía monoclonal benigna. Los sueros de los pacientes se dializaron contra agua desionizada durante tres días. Los precipitados euglobulínicos se recogieron mediante centrifugación (1400 rpm/30 minutos) y se disolvieron en PBS. Las soluciones se eliminaron mediante centrifugación (1400 rpm/30 minutos) y se sometieron a cromatografía en una columna de Superosa 6 (Pharmacia, Upsalla) equilibrada con PBS. Las fracciones correspondientes a IgM se combinaron y analizaron mediante SDS-PAGE reductora (12 % de gel). Las concentraciones de IgM se determinaron mediante tinción de los geles de SDS con Cypro Orange (Molecular Probes, Eugene) y el posterior barrido en Storm 840 (Molecular Dynamics). Las IgM monoclonales (Sigma, St Louis) se usó como patrón para la medición de la concentración. Las soluciones de IgM se esterilizaron mediante filtración a través de filtros de 0,22 µm.

Caracterización de la especificidad de unión a antígeno

Como ensayo para la detección selectiva preliminar de anticuerpos antes del análisis in vivo de la capacidad para producir remielinización se usó ELISA contra homogeneizado de médula espinal (SCH) de ratón. Para caracterizar adicionalmente la polirreactividad y la especificidad antigénica de anticuerpos seleccionados, se usó un ELISA contra el panel estándar de proteínas y antígenos químicos, así como análisis de los patrones de tinción del anticuerpo en tejidos neurales seccionados y sobre oligodendrocitos cultivados.

Ensayo ELISA

Se realizó detección selectiva de los anticuerpos según su reactividad al homogeneizado de médula espinal (SCH) de ratón. SCH a una concentración de 0,01 mg/ml se introdujo en placas de microtitulación de poliestireno en tampón carbonato 0,1M, a pH 9,5, durante 18 horas a 4 °C y después se lavaron 3 veces con PBS. Las placas revestidas se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo diluido a 10 µg/ml en tampón de bloqueo durante 2-24 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con PBS/0,05% de Tween 20 y el anticuerpo añadido se detectó con anti-IgM o IgG de cabra biotinilada, seguida de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, con p-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico. La absorbancia de la reacción se mide a 405 nm.

También se analiza la reactividad de los anticuerpos frente a un panel de antígenos proteicos (espectrina eritrocitaria humana, cadena pesada de miosina bovina, hemoglobina de ratón, transferrina bovina, vimentina bovina, lisozima de huevo de pollo, actina de conejo, proteína básica de la mielina de conejo, hemocianina de lapa californiana) y haptenos químicos acoplados a seroalbúmina bovina (BSA) (4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (NP), feniloxazolona (PhoX), axofeniltrimetilamonio (TMA), fluoresceína (FL), azofenilfosforil-colina (PC), azofenilarsonato (Ars), trinitrofenil acetilo (TNP)). Las proteínas se usan a 5 µg/ml y haptenos acoplados a BSA se usan a una concentración de hapteno 2 µM. Los antígenos se introducen en las placas de microtitulación de poliestireno, reaccionaron con anticuerpo y los anticuerpos unidos se detectan como se ha descrito para ELISA con SCH.

Tinción de sección tisular

Como fuente de tejido neural se usa cerebelo de rata neonata para la comparación de patrones de tinción de anticuerpos. Tejido fresco sin fijar se incluye en agarosa al 2% de bajo punto de fusión y se corta en secciones sagitales de 300 µm en un triturador de tejido Mcllwain Tissue Chopper. Las secciones no se fijan y se conservan a 4 °C o en hielo a lo largo del resto del procedimiento. Las láminas se transfieren a placas de cultivo tisular de 48 pocillos en sales equilibradas de Earles tamponadas con HEPES ((E/H) y se bloquearon durante 30 minutos en E/H con 5% de BSA. Las secciones se tiñen con anticuerpo primario a 10 µg/ml en E/H con 1% de BSA durante 2-12 horas a 4 °C. Las secciones se lavan 3 veces en E/H y se incuban con un anticuerpo secundario fluorescente adecuado en E/H con 1 % de BSA durante 2 horas. Las secciones se lavan 3 veces en E/H, 1 vez en PBS y después se fijan con 4% de paraformaldehído durante 30 minutos. Las secciones se lavan 3 veces con PBS y se montan en 90 % de glicerina con 2,5 % de 1,4-diazabicio[2.2.2]octano para prevenir el fotoblanqueo.

Tinción de oligodendrocitos cultivados

Se diseccionan los hemisferios cerebrales de ratas Sprague-Dawley P0-P3 y se retiran las meninges y vasos sanguíneos. El tejido se tritura y se transfiere a una solución de tripsina al 0,25% en sales equilibradas de Earles tamponadas con HEPES (E/H) sin calcio ni magnesio, hasta un volumen final de 10 ml por cerebro. El tejido

se agita a rpm baja a 37 °C durante 30 minutos y, después, se añade suero bovino fetal inactivado con calor hasta una concentración final del 10 % para inactivar la tripsina. Se añaden MgSO₄ y ADNasa (hasta 0,1 % y 20 µg/ml, respectivamente) y el tejido se agita durante 5 minutos adicionales. Las células se lavan mediante centrifugación y se resuspenden en E/H con ADNasa I y se disocian mediante trituración a través de una pipeta de vidrio. Los residuos grandes se dejan sedimentar y el sobrenadante celular superior se lava mediante centrifugación a través de una almohada de 4% de BSA en E/H. El sedimento celular se resuspende en medio de cultivo y las células se siembran a 2,5 x 10⁵ células por cm² en placas de cultivo de poli-D-lisina. Las placas se agitan para aislar los progenitores de oligodendrocitos el día 9-12. En este momento hay una diseminación fenotípica completa de oligodendrocitos en el cultivo con progenitores presentes en la capa superior en grupos de células recientemente divididas. Los progenitores de oligodendrocitos se aíslan mediante agitación suave los cultivos, se vuelven a sembrar placas sobre cubiertas revestidas con polilisina y se estimularon para diferenciar mediante la eliminación de los factores de crecimiento del medio de cultivo.

La tinción de la superficie viva se realiza a 4 °C durante 15 minutos sobre células no fijadas después de bloquear con PBS y 5% de BSA. La tinción intracelular se realiza tras fijación con 4% de paraformaldehído y permeabilización con 0,1 % de Triton-X-100. Los anticuerpos primarios se detectan con anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína. Los cubreobjetos se montan en 90 % de glicerina con 2,5 % de 1,4-diazabicio[2.2.2]octano para prevenir el fotoblanqueo y se ven en un microscopio de epifluorescencia.

Transferencia de tipo western

El TMEV purificado (Njenga y col., 1996) se separó mediante SDS-PAGE sobre geles de acrilamida al 15 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia. La membrana se bloqueó con solución salina tamponada con Tris que contiene 5% de leche seca desgrasada y 0,05 % de Tween 20 durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se incubó con IgM humana combinada, IgG humana combinada, IgM de dos apcientes con macroglobulinemia de Waldenstrom y Ac anti-TMEV policlonal de conejo (1:2000) (Njenga y col., 1996) durante 4 horas a temperatura ambiente. Todas las Ig humanas se usaron a la misma concentración (10 µg/ml). Las Ig unidas se detectaron con anticuerpos anti-humanos de cabra biotinilados o anticuerpos anti-conejo de cabra biotinilados (ambos de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) y estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y azul de nitro-tetrazolio (BCIP/NBT).

B. Estimulación de la remielinización usando anticuerpos monoclonales humanos:

Desmielinización inducida por TMEV - Para la producción de la desmielinización inducida por TMEV se realiza inyección de virus intracerebral en animales de 4-6 semanas de edad ligeramente anestesiados con metofano. El virus se inyecta usando una aguja de 37 gauge con una jeringuilla de Hamilton que libera un volumen de 10 µl que contiene 2 x 10⁵ UFP de la cepa de Daniel de TMEV. La inyección intracerebral tiene como resultado una incidencia superior al 98 % de infección viral crónica con desmielinización. Los animales crónicamente infectados para los experimentos de remielinización son, en general, de 6-8 meses tras la infección.

Protocolo del tratamiento con anticuerpos

Los animales con desmielinización crónica reciben inyecciones intraperitoneales (IP) de anticuerpos purificados en solución salina tamponada con fosfato. Para los animales infectados por TMEV, el programa de inyección consiste en inyecciones dos veces a la semana de 50 µg en 100 ml. La duración del tratamiento con anticuerpos es de cinco semanas (500 µg de dosis total). Después, se sacrificó a los animales y el tejido de médula espinal se procesa para su evaluación morfológica tal como se describe más adelante. Para cada tratamiento con un anticuerpo diferente, en nueve ratones SJL/J hembra crónicamente infectados se inyecta el anticuerpo. Al final del periodo de tratamiento, seis de los animales se perfunden y procesan para la cuantificación morfométrica de desmielinización/remielinización y se sacrificó a tres para obtener tejido congelado que se usa para la evaluación de la integridad del axon. Para cualquier anticuerpo dado se requieren tres ensayos de tratamiento por separado, con resultados reproducibles y consistentes, antes de que los datos se consideren significativos. Como controles negativos se incluyen grupos control con PBS y con isotipo, para cada nuevo experimento de tratamiento con anticuerpo.

Evaluación morfológica de la remielinización/remielinización

Al final de cada experimento, la médula espinal de cada animal se evaluará histológicamente. Se anestesió a los ratones con pentobarbital y se perfundieron mediante administración intracardiaca de agente de fijación (formaldehído al 4% tamponado con fosfato con glutaraldehído al 1 %, pH 7,4). Se retiran las médulas espinales y se seccionan coronalmente en bloques de 1mm, se fijan después con osmio y se incluyen en araldita. De cada bloque se cortan secciones transversales de un micrómetro de espesor y se tiñen con parafenilendiamina al 4 %.

Esta técnica es reproducible y permite la visualización constante de las vainas de mielina en la sustancia

blanca de la médula espinal.

La desmielinización y remielinización se cuantifican usando un sistema de análisis digital interactivo Zeiss (ZIDAS) y una cámara lúcida. Para cada ratón se analizan diez secciones transversales de médula espinal que atraviesan toda la médula, desde las regiones de la columna cervical a la espinal porximal coccígea. El área total de la sustancia blanca, el área de desmielinización y el área de remielinización se determinan para cada sección y las áreas de las diez secciones analizadas para un ratón específico se añaden para proporcionar las áreas totales para cada ratón. Las áreas de desmielinización se caracterizan por cantidades grandes de residuos de mielina, residuos que tragan los macrófagos, infiltración celular y axones desnudos. La remielinización de los oligodendrocitos se caracteriza por áreas de axones con vainas de mielina anormalmente finas y ausencia de células de Schwann. La comparación estadística de la extensión de la desmielinización y de la remielinización se realiza usando la prueba t de Student.

Desmielinización inducida por lisolecitina

Para estos experimentos, se anestesió a ratones SJL/J de 12 semanas de edad con pentobarbital sódico y se realiza una laminectomía dorsal en la región torácica superior de la médula espinal. Se usa una aguja de 34 gauge unida a una jeringuilla Hamilton para inyectar 1 µl de una solución al 1 % de lisolecitina directamente en el lado dorsolateral de la médula. Se sacrifica a los animales a los 21 días de la inyección y la región de la médula espinal en la que se realizó la inyección se elimina y procesa para su evaluación morfológica.

Como segundo modelo de desmielinización se usó la inyección intraespinal de lisolecitina. Ratones SJL/J de 12 semanas de edad fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0,08 mg/g). Se realizaron laminectomías dorsales sobre la región torácica superior de la médula espinal y se inyectó lisolecitina (L-α-lisofosfatidilcolina) (Sigma, St. Louis, MO) como se ha descrito previamente (Pavelko y col., 1998). Brevemente, se usó una aguja de 34 gauge unida a una jeringuilla de Hamilton montada sobre un micromanipulador estereotáctico para inyectar una solución al 1 % de lisolecitina en PBS estéril (pH 7,4) con azul de evan añadido como marcador. La aguja se insertó en la parte dorsolateral de la médula espinal, se inyectó 1 µl de lisolecitina y, después, se retiró lentamente la aguja. La herida se suturó en dos capas y los ratones se recuperaron. El día de la inyección de lisolecitina se denominó día 0.

Siete días después de la inyección de lisolecitina, se trató a los ratones con una inyección en bolo intraperitoneal de IgM humana o IgG humana (1 mg/cada inyección). Se trató a los ratones control con una inyección en bolo intraperitoneal de PBS. Tres semanas y cinco semanas después de la inyección de lisolecitina, se sacrificó a los ratones y se prepararon secciones de un µm de espesor como se ha descrito en la sección anterior. El bloque de araldita que mostraba la lesión de desmielinización inducida con lisolecitina más grande se usó para el análisis cuantitativo. El área total de la lesión se cuantificó usando un sistema de análisis digital Zeiss. El número total de las fibras remielinizadas se cuantificó usando un sistema de análisis informático/microscopio Nikon. Los datos se expresaron en forma del número de axones remielinizados/mm² de la lesión.

Los ratones tratados con lisolecitina recibieron inyecciones IP de 50 µg del anticuerpo los días 0, 3, 7, 10, 14, y 17 tras la inyección de lisolecitina. Se sacrifica a los animales el día 21 después de la inyección de lisolecitina. Los inventores encontraron de forma rutinaria efectos del tratamiento estadísticamente significativos con grupos de tratamiento experimental de diez animales. Los grupos control con PBS y de isotipo sirvieron como controles negativos.

C. Mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales humanos que estimulan la remielinización:

Análisis fluorescentes ratiométricos de Ca²⁺

Los cultivos mixtos de glías primarias, desde el día 2-4 tras el nacimiento de los cachorros de rata, se siembran sobre subobjetos revestidos con poli-D-lisina y se cultivan durante 5-7 días antes del análisis. Fura-2-AM y Pluronic F-127 se mezclan a 1:1 y se añaden a DMEM (sin suero) para dar Fura-2 4 mM en solución (medio de carga Fura-2).

Los cubreobjetos con células se lavan una vez con DMEM y después se incuban en medio de carga Fura-2 durante 60 minutos a 37 °C. Después, las células se lavan 4 veces en DMEM. El cubreobjetos se monta en una cámara de registro en un microscopio de fluorescencia invertido conectado a un sistema de adquisición de datos controlado por ordenador, que captura imágenes digitales de emisión de fluorescencia a 510 nm, a dos longitudes de onda de excitación diferentes: 340 nm y 380 nm. Para cada registro, las imágenes digitales se capturan de una célula individual, a intervalos de 10 segundos durante 600-800 segundos. La concentración relativa interna de Ca²⁺ se calcula como la proporción de 340 nm/380 nm de fluorescencia. Todos los registros se realizan a 37 °C en 1 ml DMEM.

El anticuerpo de ensayo se introduce añadiendo 50 µl de la solución madre de anticuerpo concentrado (60

mg/ml en PBS) a la cámara de registro para dar una concentración final de 3 mg/ml. Después de registrar los efectos de la adición de los anticuerpos de ensayo, se añaden 50 ml de una reserva de ionóforo de calcio (Br-A23187 20 mM en PBS), para dar una concentración final de 10 mM.

5 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la inmunoglobulina (Ig) humana normal, especialmente la IgG, administrada por vía intravenosa (IVIg) es eficaz en el tratamiento de varias enfermedades neurológicas autoinmunitarias, incluido el síndrome de Guillain-Barré (van der Mech y col., 1992), neuropatías desmielinizantes idiopáticas crónicas (van Doom y col., 1991), neuropatía motora multifocal (Chaudhry y col., 1993), polimiositis (Cherin y col., 1991), y miasthenia gravis (Edan y Landgraf, 1994). Los mecanismos mediante los que actúa la Ig no están claros. Algunos investigadores también han sugerido que esta terapia puede ser eficaz en las enfermedades del SNC autoinmunitarias mediadas por linfocitos T, tal como esclerosis múltiple (EM) (van Engelen y col., 1992; Achiron y col., 1992; Fazekas y col., 1997; Achiron y col., 1998; Sorensen y col., 1998).

Los inventores han usado la desmielinización inducida por el virus de la encefalomiелitis murina de Thelie (TMEV) como modelo para desarrollar nuevos tratamientos para la EM. Cuando este picornavirus se inocula por vía intracerebral en cepas susceptibles de ratones, el TMEV induce desmielinización del SNC progresiva mediada por el sistema inmunitario que es clínica y patológicamente similar a la EM. Los inventores han probado que múltiples IgM de ratón (anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos del SNC normal estimulan la remielinización del SNC tras desmielinización inducida por TMEV (Miller y col., 1994; Asakura y col., 1998). También se demostró que el anticuerpo prototípico, denominado SCH94.03, potenciaba la tasa de remielinización espontánea del SNC tras desmielinización inducida con lisolecitina (Pavelko, y col., 1998) y disminución de la gravedad y la frecuencia de las recaídas en un modelo de recaída de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Las características frecuentes de estos AcMo IgM que estimulan la remielinización son que reaccionan a antígenos de superficie sobre los oligodendrocitos y tienen características fenotípicas y genotípicas de los autoanticuerpos naturales (Miller y Rodriguez, 1995; Asakura y col., 1998). Los autoanticuerpos naturales tienen un amplio espectro de reactividades con antígenos propios y no propios. Estos anticuerpos representan una fracción principal del repertorio de IgM circulantes normales. Aunque su función fisiológica se desconoce, los efectos beneficiosos de los autoanticuerpos naturales se han comunicado en varios modelos de enfermedades autoinmunitarias, incluidas miasthenia gravis, lupus eritematoso sistémico y diabetes no obesa (Sundblad y col., 1989; Hentati y col., 1994; Andersson y col., 1991, 1994).

La IVIg se purifica a partir de grupos de plasma humano de 3.000 a 10.000 donantes sanos y contiene más del 95% de IgG y cantidades insignificantes de IgM (Dalakas, 1997). En base a las observaciones previas de los inventores, éstos postularon la hipótesis de que la IgM humana de donantes sanos, que está enriquecida en autoanticuerpos naturales, sería un tratamiento más eficaz para la enfermedad desmielinizante que la IVIg convencional. Para analizar esta hipótesis, los inventores trataron crónicamente a los ratones infectados por TMEV con IgM humana combinada obtenida de más de 2.500 donantes sanos y se analizó la remielinización del SNC.

En este estudio, los inventores demostraron que el tratamiento con IgM humana combinada de donantes sanos tuvo como resultado una remielinización significativamente potenciada por los oligodendrocitos en ratones infectados por TMEV en comparación con el tratamiento con IgG humana combinada o PBS. Los inventores confirmaron mediante ELISA e inmunohistoquímica que la IgM humana combinada contiene una población de autoanticuerpos naturales polirreactivos a proteínas y haptenos. Esta es la primera demostración de que la IgM policlonal humana estimula la remielinización del SNC en modelos de enfermedad desmielinizante, lo que plantea la posibilidad de que la IgM de donantes sanos puede ser más eficaz para tratar enfermedades desmielinizantes inflamatorias humanas que la IgG humana combinada convencional.

Que se sepa, la IgM humana combinada nunca se ha analizado en la EM, aunque se ha demostrado que es segura y eficaz en las infecciones graves e inmunodeficiencia.

Los autoanticuerpos naturales son una fracción principal del repertorio de IgM. En autoanticuerpos naturales de ratones son, exclusivamente IgM, mientras que en autoanticuerpos naturales de seres humanos son también de los isotipos de IgG aunque con mucho menos frecuencia. Hasta la fecha, los únicos AcMo que se ha demostrado que potencian la remielinización han sido IgM reactiva frente a oligodendrocitos (AcMo), que tienen características genotípicas y fenotípicas de autoanticuerpos naturales (Asakura y col. 1998).

En conclusión, los inventores han demostrado que una técnica de detección selectiva lógica se puede usar para identificar anticuerpos monoclonales humanos que tienen el potencial de estimular la remielinización en sistemas modelos de desmielinización. Las propiedades del anticuerpo, tal como la especificidad del SNC, la capacidad de reconocer los antígenos presentes en los oligodendrocitos y una fuerte unión al homogeneizado de médula espinal, combinados, se puede predecir qué anticuerpos son los mejores candidatos para analizar la remielinización in vivo. Muchos de estos anticuerpos monoclonales se unen bien al SNC humana, lo que proporciona un motivo para esperar que algunos pueden ser útiles como terapia para tratar con éxito la enfermedad humana.

A continuación se presenta una lista alfabética de las referencias citadas en este Ejemplo.

- 5 Asakura, K., D.J. Miller, K. Murray, R. Bansal, S.E. Pfeiffer, y M. Rodriguez. 1996a. Monoclonal autoantibody SCH94.03, which promotes central nervous system remyelination, recognizes an antigen on the surface of oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 43:273-281.
- 10 Asakura, K., D.J. Miller, R.J. Pogulis, L.R. Pease, y M. Rodriguez. 1996b. Oligodendrocyte-reactive O1, O4, and HNK1 monoclonal antibodies are encoded by germline immunoglobulin genes. *Mol.Brain Res.* 34:282-293.
- 15 Asakura, K., D.J. Miller, L.R. Pease, y M. Rodriguez. 1998. Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *Journal of Neuroscience* 18:7700-7708.
- 20 Blakemore, W.F., R.A. Eames, K.J. Smith, y W.I. McDonald. 1977. Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J.Neurol.Sci.* 33:31-43.
- 25 Crang, A.J. y W.F. Blakemore. 1991. Remyelination of demyelinated rat axons by transplanted mouse oligodendrocytes. *GLIA.* 4:305-313.
- 30 Dubois-Dalcq, M. y R. Armstrong. 1990. The cellular and molecular events of central nervous system remyelination. *Bioessays* 12:569-576.
- 35 Franklin, R.J., A.J. Crang, y W.F. Blakemore. 1991. Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord. *J.Neurocytol.* 20:420-430.
- 40 Groves, A.K., S.C. Barnett, R.J. Franklin, A. J. Crang, M. Mayer, W.F. Blakemore, y M. Noble. 1993. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells *Nature.* 362:453-455.
- 45 Jeffery, N.D. y W.F. Blakemore. 1995. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *Journal of Neurocytology* 24:775-781.
- 50 Lang, W., M. Rodriguez, V.A. Lennon y P.W. Lampert, 1984, Demyeliantion and remyelination in murine viral encephalitis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* B436: 98-102.
- 55 Ludwin, S.K. 1981. Pathology of demyelination and remyelination *Adv.Neurol.* 31: 123-168.
- 60 Ludwin, S.K. 1987. Remyelination in demyelinating diseases of the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 3: 1-28.
- 65 Ludwin, S.K. 1989. Evolving concepts and issues in remyelination. *Dev.Neurosci.* 11:140-148.
- 70 Miller, D.J., K.S. Sanborn, J.A. Katzmann, y M. Rodriguez. 1994. Monoclonal autoantibodies promote central nervous system repair in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 14:6230-6238.
- 75 Miller, D.J. y M. Rodriguez. 1995. Spontaneous and induced remyelination in multiple sclerosis and the Theiler's virus model of central nervous system demyelination. [Review] [119 refs]. *Microscopy Research & Technique* 32: 230-245.
- 80 Miller, D.J., K. Asakura, y M. Rodriguez. 1995. Experimental strategies to promote central nervous system remyelination in multiple sclerosis: insights gained from the Theiler's virus model system. *J Neurosci Res.* 41:291-296.
- 85 Miller, D.J. y M. Rodriguez. 1995. A monoclonal autoantibody that promotes central nervous system remyelination in a model of multiple sclerosis is a Natural autoantibody encoded by germine immunoglobulin genes, *J Immunol* 154:2460-2469.
- 90 Miller, D.J., C. Rivera-Quinones, M.K. Njenga, J. Leabowitz, y M. Rodriguez. 1995a. Spontaneous CNS remyelination in beta(2) microglobulin-deficient mice following virus-induced demyelination. *J Neurosci* 1545:8345-8352.
- 95 Miller, D.J., K. Asakura y M. Rodriguez, 1995b. Experimental strategies to promote central nervous system remyelination in multiple sclerosis: insights gained from the Theiler's virus model system *J. Neurosci. Res.* 56: 65-73.

Miller, D.J., J.J. Bright, S. Sriram, y M. Rodriguez. 1997. Successful treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a monoclonal natural autoantibody. *Journal of Neuroimmunology* 75:204-209.

Pavelko, K.D., B.G. van Ehgelen y M. Rodriguez 1998. Acceleration in the rate of CNS remyelination in lyso lecithin-induced demyelination. *J. Neurosci.* 18: 2498-2505.

Prineas, J. W. y F. Connell. 1979. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 5:22-31.

Prineas, J.W., R.O. Barnard, E.E. Kwon, L.R. Sharer, y E.S. Cho. 1993. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33:137-151.

Raine, C. S. and E. Wu. 1993. Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 52: 199-204.

Rivera-Quinones, C., D.B. McGavern, J.D. Schmelzer, S.F. Hunter, P.A. Low, y M. Rodriguez. 1998. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nature Med* 4:187-193.

Rodriguez, M., V.A. Lennon, E.N. Benveniste, y J.E. Merrill. 1987. Remyelination by oligodendrocytes stimulated by antiserum to spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46:84-95.

Rodriguez, M., E. Oleszak, y J. Leibowitz. 1987a. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit.Rev.Immunol.* 7:325-365.

Rodriguez, M. y V.A. Lennon. 1990. Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann.Neurol.* 27:12-17.

Rodriguez, M. 1991. Immunoglobulins stimulate central nervous system remyelination: electron microscopic and morphometric analysis of proliferating cells. *Lab Invest.* 64:358-370.

Rodriguez, M. y B. Scheithauer. 1994. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 18:3-13.

Smith, K.J., W.F. Blakemore, and W.I. McDonald. 1981. The restoration of conduction by central remyelination. *Brain.* 104:383-404.

Traugott, U., S.H. Stone, y C.S. Raine. 1982. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. treatment with combinations of myelin components promotes clinical and structural recovery. *J.Neurol.Sci.* 56:65- 73.

Ejemplo 2

DETECCIÓN SELECTIVA DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE EPÍTOPO CON UN AUTOANTICUERPO

En este ejemplo se describe la identificación y preparación de péptidos que imitan los antígenos reconocidos, o porciones de los mismos, correspondientes a los autoanticuerpos de la invención. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, dichos péptidos pudieron servir como vacunas para producir una respuesta inmunitaria potenciada a las afecciones indicadas que responde de forma favorable a mayores niveles circulantes de anticuerpos.

Un ejemplo de estrategia para la identificación de miméticos peptídicos sería buscar péptidos que se unen específicamente a, por ejemplo, el anticuerpo HNK-1, un autoanticuerpo de ratón demostró que podía inducir demielinización. El antígeno del epítipo de HNK-1 es un hidrato de carbono. El epítipo de HNK-1 se expresa principalmente en los glicolípidos y las glicoproteínas del tejido nervioso (McGarry y col., (1983) *Nature* 306:376-378; Ilyas y col., (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122:1206-1211; Kruse y col., (1984) *Nature* 311:153-155; 35 Yuen y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:8924-8931). La estructura que reacciona con el anticuerpo HNK-1 fue descrita por primera vez por Chou y Jungalwala para el glicolípid antigénico mayoritario presente en los nervios periféricos humanos. La composición, enlace del azúcar, configuración y posición del grupo sulfato se caracterizaron como sulfato-3 GlcA β (1-3) Gal β (1-4) GlcNAc β (1-3) GalNAc β (1-3) Gal β (1-4) Glc β (1-1)-ceramida para SGGL-1 y como sulfato-3 GlcA β (1-3) Gal β (1-4) GlcNAc β (1-3) Gal β (1-4) GlcNAc β (1-3) Gal β (1-4) Glc β (1-1)-ceramida para SGGL-2. (Chou y col., 1986).

La detección selectiva en bibliotecas de péptidos aleatorios expresados en fagos ofrece una fuente rica de diversidad molecular y representa un potente medio de identificar ligandos peptídicos que se unen a una molécula

receptora de interés. Los fagos que expresan péptidos de unión se seleccionan mediante purificación por afinidad con la diana de interés. Este sistema permite un gran número de fagos que se van a someter a detección selectiva a la vez. Dado que cada fago infeccioso codifica una secuencia aleatoria expresada sobre su superficie, un fago concreto, cuando se recupera de una matriz de afinidad, se puede amplificar mediante otro ciclo de infección. Por tanto, las moléculas selectoras inmovilizadas sobre un soporte sólido se pueden usar para seleccionar los péptidos que se unen a ellas. Este procedimiento revela un número de péptidos que se unen al selector y que a menudo muestran una secuencia de aminoácidos consenso habitual. La amplificación biológica de miembros seleccionados de la biblioteca y la secuenciación permite la determinación de la estructura primaria del(los) péptido(s).

El ligando peptídico identificado mediante expresión en fagos con frecuencia interaccionan con sitio(s) de unión natural sobre la molécula diana y a menudo se asemejan al (los) ligando(s) natural(es) de la diana. Aunque este sistema a menudo se ha usado para identificar epítomos peptídicos reconocidos por los anticuerpos, también se ha usado con éxito para encontrar imitadores peptídicos de las moléculas de hidrato de carbono. El trabajo dirigido hacia el uso de imitadores peptídicos en lugar de antígenos de hidratos de carbono ha sido revisado por Kieber-Emmons et al, 1998). La capacidad demostrada de un péptido para imitar un determinante de hidrato de carbono indica que, aunque la imitación se consigue usando aminoácidos en lugar de azúcares, se puede reproducir el patrón de especificidad.

Se realizó una primera detección selectiva con la biblioteca de partida amplificada de péptidos de 15 unidades. Se encontraron varios clones positivos en la unión al anticuerpo HNK-1. En la detección selectiva inicial con HNK-1, los fagos unidos se eluyeron mediante desplazamiento de pH, de modo que no hubo diferenciación entre el fago unido específicamente y no específicamente. Por tanto, se realizó una detección selectiva en la que el anticuerpo HBK-1 se biotinila con un agente de acoplamiento que incorpora un puente disulfuro. El anticuerpo biotinilado se reacciona previamente con el tubo revestido con estreptavidina, se elimina el anticuerpo no unido mediante lavado y el inmunotubo se usa para la detección selectiva. Como alternativa, los fagos reaccionan con el anticuerpo biotinilado en solución y, después, el complejo biotinilado se deja reaccionar con un inmunotubo revestido con estreptavidina. En cualquier caso, después de eliminar el fago no unido mediante lavado, el fago unido se eluye mediante la adición de diotritol, que libera el anticuerpo y el fago unido (Griffiths y col, 1994). Además, estas detecciones selectivas se realizaron en presencia de suero de ratón (12,5 %). Esto proporciona un gran exceso de IgM de ratón sobre el anticuerpo HNK-1, de modo que se debería suprimir la unión no específica al anticuerpo HNK-1.

En algunos casos, cuando el fago en solución se dejó reaccionar con anticuerpo "pre-inmovilizado" se obtuvo un incremento del número de fagos unidos tras la tercera o la cuarta ronda de selección. Los clones analizados se unieron también a la IgM de ratón total. En un experimento final, varios procedimientos se compararon en paralelo. Se dejó que los fagos se unieran al inmunotubo revestido con HNK-1 o a HNK-1 biotinilado en solución y en presencia o ausencia de suero de ratón. Se observó un enriquecimiento usando el anticuerpo pre-revestido, pero los clones seleccionados se unieron, de nuevo, a IgM de ratón total, aunque también se unieron a HNK-1. Es interesante destacar que el fago seleccionado también fue reactivo al anticuerpo L2-412, que reconoce el mismo hidrato de carbono que HNK-1, aunque HNK-1, requiere un grupo sulfato terminal, mientras que el anticuerpo L2-412 reconoce el hidrato de carbono con o sin un grupo sulfato.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Materiales

Se puede usar una biblioteca de péptidos de 15 unidades y células E.coli K91 Kan. La biblioteca de 15 unidades se construyó en el vector fUSE5, un derivado del fago filamentoso fd-tet (Scott y col., 1990). Este vector porta un gen de resistencia a tetraciclina para permitir la selección. Los fagos filamentosos no matan a sus huéspedes; por tanto, las células infectadas se convierten en resistentes a tetraciclina, siguen creciendo y secretan partículas progenie. La cepa K91Kan de E.coli es un derivado de λ mbfa de K38 (Lyons et al, 1972), tiene un genotipo cromosómico thi y porta un gen de resistencia a kanamicina (mkh) (Smith y col., 1993; Yu y col., 1996). Los péptidos y el péptido (10 mg) acoplado a BSA activada con SPDP (60 mg) mediante una cisteína en C-terminal se puede obtener de, por ejemplo, ANAWA AG, 8602 Wangen, Suiza. La tetraciclina y la kanamicina se pueden adquirir en Sigma. B. Becker purificó en el laboratorio de los inventores los glicolípidos L2/HNK-1 de la cola de caballo de vaca. Los azúcares sulfatados, SO₃-Glc-AGal-alilo, fueron proporcionados amablemente por el N. Nifant'ev, Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscú.

Anticuerpos

La caracterización y purificación del anticuerpo monoclonal (AcMo L2-412) producido en ratas y que reconoce el hidrato de carbono HNK-1 han sido descritos por Noronha, A. y col., Brain Res. 385, 237-244 (1986)). El anticuerpo L2-412 se ha depositado en el DSMZ - Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, según los términos del Tratado de Budapest, y se le ha dado

el nombre de anticuerpo HNK-1 y está disponible como TIB200 en la American Type Culture Collection (ATCC). La IgG policlonal de rata y HRP-estreptavidina se obtuvieron en Sigma (EE.UU.). El anticuerpo policlonal anti-M13/HRP se adquirió en Pharmacia Biotech. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP dirigido contra IgG de rata se obtuvo de Jackson Immunoresearch.

Amplificación de la biblioteca de partida

La biblioteca primaria que codifica los péptidos de 15 unidades se amplificó en base al procedimiento de Smith (Smith y col, 1992) del siguiente modo:

La noche antes de necesitar las células, se inocularon 2 ml de medio LB (L Bacto-Triptona, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura), que contiene 100 µg/ml de kanamicina, con células K91Kan y se agitaron durante la noche a 37 °C. Se preparó un matraz de 1 l que contiene 100 ml de caldo Terrific (12 g de Bacto-Triptona, 24 g de extracto de levadura, 5,04 g de glicerol (4 ml) se añadieron a 900 ml de agua y se sometieron a autoclave en porciones de 90 ml; a cada porción de 90 ml se añadieron antes de usar 10 ml de tampón de fosfato potásico (KH₂ PO₄ 0,17M, KH₂ PO₄ 0,72M, no se requiere ajuste de pH).

En 100 ml de caldo Terrific se inoculó 1 ml del cultivo durante la noche de células K91kan y se agitó enérgicamente hasta que la DO₆₀₀ de una dilución a 1:10 alcanzó 0,2. Después, la agitación se ralentizó durante 10 minutos para permitir la regeneración F-pili y al matraz se añadieron 10 µl de la biblioteca de partida; la agitación lenta continuó para permitir la adsorción. Después, el cultivo se transfirió a 1 l de LB que contiene 0,22 µg/ml de tetraciclina y se dejó agitar enérgicamente durante 35 minutos a 37 °C. La concentración de tetraciclina se ahistó a 20 µg/ml y se tomó un alícuota para determinar el título. Los fagos se titularon (título recuperado) sembrando las células infectadas sobre el medio de tetraciclina y contando el número de colonias resistentes a tetraciclina. Una unidad infecciosa definida de este modo se denomina unidad transformante (UT) y la infectividad es la proporción del número de UT a un número de partículas físicas. Normalmente se eliminó un alícuota de 50 µl del cultivo y se diluyó con LB que contiene 0,2 µg/ml de tetraciclina (intervalo de dilución fue 103-105). Una alícuota de 200 µl de cada dilución se extendió sobre una palca de agar que contenía 40 µg/ml de tetraciclina y 100 µg/ml de kanamicina, se incubó durante la noche a 37 °C. Las colonias se contaron al día siguiente. En esta etapa, el título de colonias resistentes a tetraciclina deberá ser de aproximadamente 10⁷/ml. El resto del cultivo se agitó enérgicamente durante la noche.

A la siguiente mañana, el sobrenadante diblemente aclarado obtenido tras 2 etapas de centrifugación (4.000 x g, 10 min, 4 °C y 10.500 x g, GSA, 10 min, 4 °C) se precipitó durante la noche a 4 °C añadiendo 0,15 volúmenes de solución de PEG/NaCl (polietilenglicol al 16,7 % en solución de NaCl 3,3M). Los fagos precipitados recogidos tras la centrifugación (10,500 x g, GSA, 40 min, 4 °C) se disolvieron en 10 ml de TBS (Tris-HCl 50 mM, pH7,5, NaCl 150 mM) y se realizó una segunda precipitación añadiendo ,15 volúmenes de solución de PEG/NaCl a la suspensión de fagos e incubando durante 1 hora en hielo. En esta etapa debería se revidente un precipitado pesado.

El sedimento obtenido tras la centrifugación (14.500 x g, SA600, 10 min, 4 °C) se volvió a disolver en 10 ml de TBS y se transfirió a un vaso Tadeo con 4,83 g de CsCl. El vaso se volvió a tarar y se añadió TBS a un peso neto de 10,75 g. Esto debería dar 12 ml de una solución al 31 % w/v de CsCl (densidad 1,30 g/ml); la solución se centrifugó 48 horas a 150.000 x g a 5 °C en un rotor SW41 (Beckman). Con la ayuda de una fuente de luz visible fuerte se pudo ver una banda no floculenta de color azulado claro (que contiene los fagos amplificados) sobre una banda estrecha blanca opaca floculenta (que probablemente deriva de PEG). La banda del fago se recogió aspirando primero lentamente el fluido sobre la banda del fago y, después, usando una pipeta, la banda del fago se retiró evitando lo más posible la banda floculenta debajo. Después, la banda del fago se liberó a un frasco de centrífuga de policarbonato, que se cargó hasta el cuello con TBS y se centrifugó en un rotor Ti70 (279'000 x g, 4h, 5°C) y se resuspendió en 2 ml de TBS por 1 l de cultivo. Los fagos se pueden almacenar de forma estable en esta forma en un refrigerador.

Después, la biblioteca amplificada se tituló (título final) del siguiente modo: Se prepararon varias diluciones del fago en TBS/gelatina (0,1 g de gelatina en 100 ml de TBS) que cubren el intervalo de dilución de 10⁷ a 10¹⁰. A continuación, se usaron 10 µl de cada una de estas diluciones para infectar 10 µl de células K91kan preparadas como se ha descrito al principio de esta sección y cada mezcla de dilución se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (TA) para dejar que el fago infecte las células concentradas. Se añadió un ml de LB que contiene 0,2 µg/ml de tetraciclina y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en un agitador-incubador. Después, las células infectadas se extendieron (200 µl) sobre una placa de agar que contiene 40 µg/ml de tetraciclina y 100 µg/ml de kanamicina como se ha descrito anteriormente (título recuperado).

Procedimiento de detección selectiva

A. Unión directa

La biblioteca de fagos se barrió usando inmunotubos ((Nunc., Maxisorb) revestidos con mAbL2-412. Los tubos se revistieron incubando durante la noche a 4 °C con el anticuerpo L2-412 A 10 µg/ml de proteína en PBS (1 ml de volumen total) para la primera ronda y 1 µg/ml para la segunda y tercera ronda de detección selectiva. Después de bloquear 2 horas con Blotto (5 % de leche seca sin grasa, 0,05 % (v/v) Tween 20 en PBS) A 4 °C. 10¹¹ unidades transformantes (en un volumen de 250 µl) de la biblioteca de fagos por inmunotubo se jaron unir 1 hora a 37 °C en una cámara rotatoria. Para las rondas segunda y tercera, los fagos se preincubaron 1 hora con 100 µg/ml de IgG de rata antes de añadirlos al inmunotubo, con el fin de disminuir el número de aglutinantes no específicos. Después de la recuperación de los fagos no unidos (de los que se eligió el fago control negativo), los tubos se lavaron 10 veces con PBS-0,05% (v/v) Tween 20 y eluyeron con glicina 0,1M a pH 2,2 (0,5-1 ml de volumen total), 1° in a 4 °C. Los fagos eluidos se neutralizaron con Tris 1,5M a pH 9 y después se usaron para infectar 0,5-1 ml de células E. coli K91 Kan en fase log 15 minutos a temperatura ambiente. Las bacterias infectadas se transfirieron a 20 ml de LB que contiene 0,2 µg/ml de tetraciclina y, después de extraer un alícuota para la determinación del título (título recuperado), se dejaron crecer durante la noche como se ha descrito en la sección anterior. Después, el eluado amplificado se centrifugó dos veces (10 min, 3660 x g, 10 min, 14.500 x g, SA600) y el sobrenadante final se precipitó con 0,15 volúmenes de PEG/NaCl durante la noche a 4 °C. El fago se sedimentó (15 min, 14,500 x g, SA600) y se disolvió en 1 ml de PBS pipeteando y agitando en vórtex, se microcentrifugó 1 minuto para sedimentar la materia insoluble y se precipitó en PEG de nuevo durante al menos 1 hora a 4 °C. En esta etapa se debería ver un precipitado pesado. El sedimento obtenido tras 10 minutos, la microcentrifugación se disolvió por último en 200 µl de PBS que contienen 0,02 % de azida. Este eluato amplificado se puede almacenar y guardar a 4 °C. La biblioteca se sometió a tres rondas de amplificación y selección.

El mismo procedimiento se usó para la detección selectiva de HNK-1 con el anticuerpo HNK-1, a excepción de que se incluyó un exceso de 100 veces de la IgM de ratón para disminuir la unión inespecífica.

Los fagos se titularon (título final) como se ha descrito. Las colonias se contaron al día siguiente y el rendimiento de la detección selectiva se calculó dividiendo el título recuperado por el título (entrante) de la ronda anterior.

B. Detección selectiva con anticuerpo biotinilado

Para realizar esta detección selectiva se usaron dos procedimientos, ambos siguiendo los protocolos de G. Smith (protocolos no publicados). El anticuerpo HNK-1 se biotiniló como se describe más adelante usando NHS-SS-biotina. NHS-SS-biotina une la biotina a la proteína a través de un puente disulfuro, con el fin de dejar que el grupo de biotina se elimine después mediante incubación con ditiotreitól (DTT). El anticuerpo L2-412 se biotiniló de forma similar como se describe más adelante. En el procedimiento A, primero se deja que el anticuerpo biotinilado se una al inmunotubo revestido con estreptavidina, que después se usa para barrer el fago entrante. En el procedimiento B, el anticuerpo biotinilado se preincubac on el fago en solución y la mezcla de reacción se deja unir (unos pocos minutos) al inmunotubo revestido con estreptavidina.

En el procedimiento A, los inmunotubos se revistieron con 10 µg/ml de estreptavidina en PBS, 1 ml de volumen total (se humidificó la totalidad de la superficie del tubo), durante la noche a 4 °C en un rotador. Se descartó la estreptavidina y el tubo se cargó con solución de bloqueo, PBS que contiene 0,5 % de BSA (p/v), durante 2 horas a 4 °C. Después de lavar 6 veces con PBS-0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST), se añadió el anticuerpo biotinilado. Normalmente, se añadieron 3 µg del HNK-1 biotinilado o 5 µg del anticuerpo L2-412 biotinilado en 400 µl de la solución de bloqueo. Se dejó que el anticuerpo se uniera durante al menos 2 horas (o durante la noche) a 4 °C en el rotador. Después de lavar 6 veces con PBS-T, 1010 fagos de la biblioteca de partida de 15 unidades, en 400 µl de solución de bloqueo se dejaron unir al correspondiente inmunotubo revestido con anticuerpo durante 4 horas a 4 °C en el rotador. En el procedimiento B, durante el revestimiento de los inmunotubos, 1010 fagos se preincubaron durante la noche con 3 o 5 µg de HNK1 o L2-412 biotinilado, respectivamente. Después, se dejó que el anticuerpo biotinilado se uniera al inmunotubo revestido durante 10 minutos a 4 °C en el rotador. En ambos procedimientos los tubos se lavaron 10 veces, después se eluyeron los complejos fago-anticuerpo con DTT 20 Mm (0,5 ml de volumen) en PBS 1-5 minutos, a temperatura ambiente. La amplificación y la titulación se realizaron como se ha descrito en lo que antecede. La biblioteca se sometió a cuatro rondas de amplificación y selección.

Detección selectiva con ELISA

A. Unión directa para la detección de clones positivos

Colonias individuales resistentes a tetraciclina y kanamicina se cultivaron en LB con 20 µg/ml de tetraciclina en placas de 96 pocillos (Nunc) durante la noche a 37 °C (300 µl/pocillo), después se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm en centrífuga de Jouan y el sobrenadante (100 µl) se incubó durante 2 horas en otra placa de 96 pocillos previamente revestida con mAbL2 -412 (100 µl, µg/ml durante la noche a 4 °C) y se bloqueó mediante incubación durante 2 horas con PBS-0,5 % (p/v) de BSA. Después de lavar 5 veces, la unión de los fagos se detectó mediante incubación con anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP ((Pharmacia, Biotech.) durante 1 hora a una dilución de 1:2000. La reacción de la peroxidasa se inició mediante la adición de 100 µl de desarrollador que contiene 0,01 % de

peróxido de hidrógeno y 0,1 % (p/v) de ácido zino-bis(3-etilbentiazolin-6-sulfónico)-sal diamonio (ABTS, Boehringer Mannheim) en tampón HRP (acetato sódico 0,1M, NaH₂ PO₄ , 0,05M, Ph ajustado a 4,2 con ácido acético). La absorbancia del producto de reacción coloreado se determinó a 405 nm en un Multiscan TitertekPlus (Flow, Suiza). En paralelo, cada clon se analizó también en placas de 96 pocillos revestidas con IgG de rata (100 µl, 1 µg/ml en PBS y se bloquearon de forma idéntica durante 2 horas). Las bacterias productoras de los clones de unión seleccionados (es decir, los fagos positivos), que eran ligantes positivos para el mAbL2-412 pero que no se unían a la IgG de rata se sembraron en placas con agar que contenían medio LB con 40 µg/ml de tetraciclina y 100 µg/ml de kanamicina. Se escogieron dos colonias individuales y se volvió a analizar la positividad hacia el mAb L2-412. Las colonias positivas únicas se almacenaron en 40 % de glicerol a -80 °C.

B. Unión competitiva

Las placas de microtitulación (Nunc) se revistieron con los glicolípidos L2/HNK-1 (50 µl, 1 µg/ml, disueltos en EtOH) y se dejaron secar durante la noche. Bloqueado los pocillos durante 2 horas con 0,5 % (p/v) de BSA sin ácidos grasos en PBS, una concentración limitante de L2-412, previamente determinada, se preincubó con diluciones por 2 sucesivas del inhibidor, comenzando a una concentración de 2,2 mM para el péptido libre, 5 mM para el azúcar SO₃ 10¹² fagos positivos y negativos (los fagos negativos se clonaron a partir de la fracción no unida de la primera ronda de detección selectiva). Después, la mezcla preincubada se añadió al pocillo en 100 µl y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar 5 veces con PBS-0,05 % (V/V) de Tween 20, la unión del AcMo L2-412 se detectó mediante incubación con IgG anti-rata de cabra conjugada con HRP durante 1 hora, seguido de la reacción de color descrita anteriormente. El porcentaje de inhibición de la unión del AcMo L2-412 al sustrato en presencia del inhibidor se calculó con referencia al valor control obtenido en ausencia de inhibidor (0 % de inhibición).

C. Inhibición de la unión

Las placas de microtitulación se revistieron durante la noche a 4 °C con laminina (Gibco/BRL), (10 µg/ml, 100 µl), o mAbL2-412 (1 µg/ml, 100 µl) en PBS. Todas las etapas de reacción posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después de bloquear con PBS + 0,5 % (P/V) de BSA, se añadieron 50 µl de diluciones por 2 sucesivas del péptido acoplado a BSA ((ANAWA Ag, Suiza) comenzando a una concentración de 30 µM durante 1-2 horas a TA. Después se añadió un número limitante de fagos portadores del péptido de interés, previamente determinado, y se incubó durante otra hora. Los fagos unidos se detectaron con el anticuerpo antiM13/HRP como se ha descrito en la sección de detección selectiva con ELISA. El experimento análogo se realizó con L2-412 inmovilizada en lugar de laminina, el péptido acoplado a BSA que compete con la unión de los fagos positivos al anticuerpo L2-412.

D. Unión directa a laminina

Las placas de microtitulación se revistieron con 100 µl del AcMo L2-412 o con laminina, como se ha descrito anteriormente, y se añadieron 100 µl del péptido biotinilado acoplado a BSA comenzando a una concentración de 30 µM, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y se detectaron con HRP-estreptavidina.

Secuenciación de ADN

Los clones positivos, escogidos de las reservas congeladas en glicerol, se cultivaron durante la noche a 37 °C en medio LB que contiene 20 µg/ml de tetraciclina. El ADN monocatenario se purificó como describe G. Smith (1992) usando el procedimiento de doble giro, se secuenció con el kit de secuenciación de ciclos Thermo Sequenase (Amersham y se cargó sobre un secuenciador automático (B10 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc.).

Biotinilación

La biotinilación del anticuerpo HNK-1, BSA y el péptido acoplado a BSA se realizó usando Sulfo-NHS-biotina (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una proporción molar de 10 a 1 para el anticuerpo y de 5 a 1 para BSA o los péptidos acoplados a BSA. El producto biotinilado se dializó durante la noche contra PBS a 4 °C.

Experimentos de sobrecrecimiento de neuritas y cultivo

Preparación de neuronas motoras

Los cubreobjetos se esterizaron cociéndolos durante la noche a 160 °C y se revistieron mediante una incubación durante la noche con poliornitina (Sigma, 1,5 µg/ml en agua) a 4°C. Después, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con agua y después se revistieron con sustancias de ensayo del siguiente modo: 1) los conjugados BSA-péptido se disolvieron a 100 µg/ml en PBS, se sonicaron 1 minuto con un sonicador de sobremesa y se centrifugaron en una microfuga durante 20 minutos a velocidad máxima. La concentración proteica del sobrenadante se determinó cada vez con el método de Bradford (Bradford y col., 1976). Después, 120 µl del

complejo se mezclaron con 280 µl de solución de colágeno (20 µg/ml de colágeno en PBS) y se aplicaron 100 µl sobre cada cubreobjetos durante la noche a 4 °C; 2). Como control negativo, el BSA sin tratar se usó en lugar del complejo péptido-BSA; 3) los glicolípidos portadores del hidrato de carbono L2/HNK-1 se disolvieron en etanol a una concentración de 10 µg/ml y a 1 ml de la solución de colágeno descrita anteriormente se añadieron 80 µl. Para el revestimiento se usó un volumen de 100 µl. Los cubreobjetos se colocaron por cuadruplicado en una placa de 24 pocillos (NUNC) y, por último, se lavaron 3 veces antes de sembrar las células en placas (los cubreobjetos nunca se dejaron secar).

Las células neuronales motoras se prepararon como describen Arakawa (1990) a partir de médula espinal de embriones de pollo de 6 días de edad disociados en 1 ml de solución helada que contiene 0,05 % de ADNasa 1 (Sigma), 0,1 % de BSA en medio L-15 (Life Technologies). Las células se colocaron en capas sobre 2 ml de metrizamida 6,8 % (Fluka) en L-15 y se centrifugaron 15 minutos a 500 x g, 4 °C. Las células recogidas de la interfaz metrizamida/medio se diluyeron en 5 ml de L-15 y se cargaron sobre una almohada de 4 ml de BSA (4 % de BSA en IL-15) y se centrifugaron 10 minutos a 300 x g a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 0,5-1 ml de medio completo (NaHCO₃ 22 mM, glucosa 22 mM, 1 % de penicilina y estreptomycin (Gibco) en L-15 suplementado con suplemento de 1 % de N2 (Gibco) y 15 µg/ml de extracto muscular de pollo (3,5 mg/ml). 30.000 células se sembraron en placas sobre cubreobjetos revestidas con poliornitina/colágeno en presencia o ausencia del péptido acoplado a BSA y se incubaron en una cámara humidificada a 37 °C y 5 % de CO₂. La longitud y el número de neuritas se midieron y se contaron las neuronas aisladas que no estaban en contacto con otras células y con al menos un proceso tan largo como el diámetro del cuerpo celular tras 24 horas de cultivo.

Preparación y cultivo de neuronas ganglionares de la raíz dorsal

Los cubreobjetos se prepararon de forma idéntica que para los experimentos con neuronas motoras. Las neuronas ganglionares de la raíz dorsal se aislaron de huevos de pollo de 11 días embrionario. Los ganglios se transfirieron en 1 ml de solución de digestión (0,05 % de tripsina, 0,01 % de ADNasa 1 en medio HBSS) y se incubaron 15 minutos a 37 °C con resuspensión cada 2-5 minutos. Los ganglios se disociaron después en 1 ml de solución de disociación helada (0,05 % de ADNasa 1, 0,1 % de BSA en medio L15), se cargaron en 3 ml de una almohada de 4% de BSA en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 4 °C, 600 x g durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en 0,5 ml del medio completo descrito en la sección anterior. 20.000 células se añadieron a los pocillos que contienen un cubreobjetos y se dejaron crecer durante 18 horas en una cámara humidificada a 37 °C y 5% de CO₂, la fijación y el análisis del sobrecrecimiento de neuritas se realizó como se ha descrito en la sección precedente.

Inmunohistología e inmunocitología

Inmunohistología

Se usaron crio secciones de nervio femoral de un ratón de 4 meses para buscar la unión del complejo péptido-BSA. Las secciones se trataron durante 1 h con 1% de H₂O₂, 0,5 % de soroalbúmina bovina (BSA) y 10 % de suero de cabra en PBS con el fin de reducir la actividad de peroxidasa endógena. Después, las secciones se incubaron durante la noche a 4 °C con complejo péptido-BSA o BSA (1 mg/ml en PBS, 150 µl/cubreobjetos) y después se lavaron 4 veces con PBS-0,01 % de Tween 20. Para la detección, se añadió anticuerpo anti-BSA (Sigma, dilución 1:16, 150 µl/cubreobjetos) y se incubó durante la noche a 4 °C. Se añadió suero anti-conejo de cabra acoplado a HRP (1:2000) durante 1 hora en un volumen de 150 µl por cubreobjetos. La reacción de color se desarrolló usando una dilución al 5 % de una solución madre de 4 mg/ml de 9-amino-3-etilcarbazol (AEC, Fluka) en N,N'- dimetilformamida en tampón acetato sódico 0,1M, pH 4,8, que contiene 0,1 % de H₂O₂. Para el control positivo se usó el anticuerpo L2-412 y el anticuerpo anti-rata de cabra acoplado a HRP. Se realizó un experimento similar usando el conjugado BSA-péptido biotinilado. Se usó una concentración de 50 µg/ml para la incubación durante la noche y se añadió estreptavidina acoplada a HRP (1:2000) durante 1 hora. La reacción de color se desarrolló como se ha descrito en lo que antecede.

Inmunocitología

Los cubreobjetos se revistieron con poliornitina (1,5 µg/ml), después con colágeno (20 µg/ml) y 40.000 células se dejaron cultivar durante 40 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % como se ha descrito anteriormente. Los cubreobjetos fijos se bloquearon después en 5 % de polvo de leche seca sin grasa en PBS durante 2 horas. Después de un extenso lavado con PBS-0,05 % de Tween-20, se añadió el conjugado BSA-péptido biotinilado a una concentración de 50 µg/ml durante 4 horas. Después de otras seis etapas de lavado, la detección se realizó usando estreptavidina acoplada a HRP, 1:500, durante 1 hora. La detección del color fue como se ha descrito anteriormente para la inmunohistología. Las neuronas fijadas se fotografiaron a un aumento de 40 X. Las imágenes presentadas se procesaron para la rendición potenciada del color usando Adobe Photoshop.

A continuación se presenta una lista alfabética de las referencias citadas en este Ejemplo.

Chou, D., y Jungalwala, F. J. Biol. Chem. 268, 21727-21733 (1993).
 Chou, D.K., y col., J. Biol. Chem. 261, 11717-25 (1986).
 Griffiths, A. y col. (1994) EMBO J. 13:3245-3260.
 Kieber-Emmons, T. Immunologic Research 17, 95-108 (1998).
 Lyons, L. y Zinder, N. (1972) Virology 49:45-60.
 Scott, J.K. y Smith, G.P. (1990) Science 249:386-390.
 Smith G.P. y Smith, J.K. (1993) Methods Enzymol. 217:228-257.
 Yu, J. and Smith, G. (1996) Methods Enzymol. 267:3-27.

EJEMPLO 3

ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS REACTIVOS A OLIGODENDROCITOS ESTIMULAN LA REMIELINIZACIÓN EN UN MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La estimulación de la remielinización, un objetivo principal de un tratamiento eficaz para las enfermedades desmielinizantes, tiene el potencial de proteger los axones vulnerables, incrementar la velocidad de conducción y mejorar los déficit neurológicos. Las estrategias para estimular la remielinización se han centrado en el trasplante de oligodendrocitos (OL) o reclutar células mielinizantes endógenas con factores tróficos. Las terapias basadas en inmunoglobulina (Ig) usadas de forma rutinaria para tratar diversas enfermedades neurológicas y autoinmunitarias, subraya nuestro enfoque para potenciar la remielinización. Los inventores han aislado dos anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos de superficie de OL que estimularon una remielinización significativa en un modelo mediado por virus de esclerosis múltiple (EM). Cuatro AcMo humanos adicionales de unión a OL no estimularon la remielinización. Los AcMo humanos fueron tan eficaces como la inmunoglobulina intravenosa humana (IVIC), un tratamiento que se ha demostrado que tiene eficacia en la EM, y se unieron a la superficie de los OL humanos, lo que sugiere un efecto directo de los AcMo sobre las células responsables de la mielinización. Como alternativa, dirigir los AcMo humanos a áreas de patología del sistema nervioso central (SNC) puede facilitar la opsonización de los residuos de mielina que permite que progrese la reparación. Los AcMo humanos se aislaron de los sueros de individuos con una forma de gammapatía monoclonal. Estos individuos portan un nivel elevado de proteína monoclonal en sangre sin detrimento, que proporciona soporte a la creencia de que la administración de estos AcMo como terapia es segura. Los resultados de los inventores son 1) consistentes con la hipótesis de que los AcMo reactivos al SNC, parte del repertorio de Ig normal en seres humanos, pueden ayudar a reparar y proteger al SNC de lesiones inmunitarias patogénicas y 2) retar más allá la premisa de que los AC se unen a los OL son necesariamente patogénicos.

INTRODUCCIÓN

La potenciación de la remielinización y la protección de la lesión axonal son importantes objetivos terapéuticos en el tratamiento de trastornos inflamatorios desmielinizantes del SNC, tal como la EM. Se puede producir remielinización en las placas de EM, pero es limitada (1,2) incluso cuando haya progenitores de OL presentes en el adulto (3,4). Se han analizado una serie de estrategias terapéuticas para estimular la remielinización en animales experimentales. El trasplante de OL (5) o sus progenitores (6) en tejido desmielinizado produce mielina nueva. Los progenitores de OL transplantados también pueden remielinizar las lesiones desmielinizadas en el SNC adulto (7) y migran hacia un área de daño cuando se colocan en las proximidades de la lesión (8). Sigue habiendo problemas sin resolver concernientes a la supervivencia de los progenitores de OL transplantados en el SNC intacto de adulto y su capacidad para dirigirlos a áreas de patología de la mielina (9). No obstante, si las lesiones del SNC se pueden abordar quirúrgicamente y los axones siguen intactos, el trasplante de células gliales puede ser una terapia viable para mejorar el rendimiento funcional (10).

La administración in vitro de factores de crecimiento o tróficos induce la expansión de los progenitores de OL (11, 12) o estimula los OL maduros para desdiferenciar y, posteriormente, reiniciar un programa de mielinización (13, 14). La administración in vivo de factores tróficos mediante fibroblastos sometidos a ingeniería genética al SNC dañado estimula la formación de brotes axonales y la proliferación de OL (15). Sigue habiendo obstáculos para la terapia con factor trófico in vivo, específicamente en la determinación de la concentración del factor local biológicamente relevante y el potencial de los papeles pleiotrópicos de la mayoría de los factores tróficos administrados a concentraciones altas.

Como alternativa, el laboratorio de los inventores propone reparar la patología del SNC y potenciar la remielinización endógena usando Ig de unión a SNC (16), generando una respuesta reparadora natural que ya puede regularse por incremento tras la desmielinización. La terapia con Ig puede adaptarse rápidamente y analizarse como tratamiento para la enfermedad desmielinizante humana (17,18). La premisa de nuestro enfoque es que las células capaces de remielinización y los factores necesarios para sostener su crecimiento y diferenciación están presentes en el SNC desmielinizado, pero su capacidad para producir la mielina es limitada. La heterogeneidad emergente de la patología y la diseminación de los OL en la población de EM (19) sugiere que, en la práctica, el tratamiento de la enfermedad desmielinizante humana puede requerir combinaciones de varios abordajes

terapéuticos basados en requisitos individuales.

Los inventores han usado un modelo mediado por virus de desmielinización para desarrollar una terapia basada en Ig. Cuando el virus de la encefalomyelitis murina de Theiler (TMEV) se inocula intracerebralmente en cepas susceptibles de ratones, el TMEV induce la desmielinización del SNC progresiva inmunomediada clínica y patológicamente similar a la EM (20). La eficacia de las terapias en la EM humana es similar a la observada en el modelo de TMEV (21), lo que la convierte en una plataforma importante para el diseño de ensayos clínicos. Un AcMo de ratón contra el homogeneizado de la médula espinal, denominado SCH94.03, potencia la remielinización en el modelo de TMEV (22). SCH94.03 es un AcMo de IgMk de ratón polirreactivo que se une a la superficie de los OL (23). SCH94.03 también potencia la tasa de remielinización espontánea del SNC tras la desmielinización inducida por lisolecitina (24) y disminuye la recaída en la encefalomyelitis autoinmunitaria experimental (EAE) (25). Los AcMo de IgMk de ratón adicionales de unión a OL, varios de los cuales son marcadores de rutina para el linaje de OL, también estimulan la remielinización del SNC (26).

Dado que los AcMo IgM de ratón estimulan la remielinización, los inventores han postulado la hipótesis de que la IgM policlonal humana sería un tratamiento más eficaz de enfermedad desmielinizante que la IVIg una terapia establecida para los trastornos mediados por el sistema inmunitario (27). El tratamiento de los ratones infectados crónicamente con TMEV con IgM policlonal humana dio como resultado la potenciación de la remielinización en comparación con la IVIg. También se identificaron dos AcMo IgM humanos, usando una estrategia independiente del antígeno, que estimulan la remielinización hasta un grado equivalente o superior que la IgM policlonal humana. Los inventores sugieren que los AcMo que estimulan la remielinización pueden ser una terapia eficaz de aplicación sencilla para enfermedades desmielinizantes humanas. Los AcMo humanos se pueden aplicar fácilmente a ensayos clínicos, se pueden producir sin agentes infecciosos y pueden aliviar la escasez nacional y los elevados costes de la IVIg. Un AcMo humano eficaz que estimula la remielinización también puede simplificar la investigación del mecanismo de acción de las terapias inmunomoduladoras.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Anticuerpos humanos y su aislamiento

La IgM humana normal purificada del plasma combinado de más de 2500 donantes sanos se obtuvo de S. V. Kaveri (28). La pureza de IgM fue superior al 90 % confirmado mediante SDS-PAGE. La IgG humana combinada de donantes sanos denominada clínicamente IVIg se adquirió en Miles Inc. (Elkhart, IN).

Las muestras de suero humano se obtuvieron de la clínica de disproteinemia bajo la dirección del Dr. Robert A. Kyle, Mayo Clinic, y se escogieron únicamente por la presencia de un pico clonal de Ig superior a 20 mg/ml. Los sueros procedieron de 102 pacientes con una amplia variedad de afecciones caracterizadas por picos de IgG o IgM monoclonales en suero, incluidas macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple, linfoma, gammopatía monoclonal de significado no determinado. Los sueros se dializaron frente a agua, los precipitados recogidos mediante centrifugación (14.000 rpm/30 minutos) y se disolvieron en PBS. Las soluciones se centrifugaron y se sometieron a cromatografía en columna de Superosa-6 (Pharmacia, Upsalla, Suecia). Las fracciones de IgM se combinaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Las concentraciones se determinaron mediante tinción en gel con densitometría Sypro Orange (Molecular Probes, Eugene, OR). Las soluciones de IgM se esterilizaron mediante filtración a la crioconservaron.

Cultivo de células OL e inmunocitoquímica

Se prepararon hemisferios cerebrales de ratas Sprague-Dawley Holtzman P0-P2 para cultivos mixtos de células gliales primarias como se ha descrito (29) y se cultivaron durante 9 días in vitro. Los progenitores de OL de rata se aislaron como se ha descrito (30). Los OL humanos adultos se prepararon a partir de biopsias del lóbulo temporal obtenidas de pacientes sometidos a resección terapéutica por epilepsia intratable. El tejido no contenía el foco epiléptico y tenía una citoarquitectura normal cuando se analizó por el Departamento de Patología Quirúrgica. Las células gliales adultas aisladas como se ha descrito (31) y se sembraron en cubreobjetos de múltiples pocillos de plástico (Becton Dickinson) revestido con poliornitina (Sigma) y laminina (Life Technologies) o de vidrio (Fisher Scientific) en un medio definido de DMEM/F12 suplementado con biotina (0,01 mg/ml), triyodotironina (15 nM), BAS al 0,5 % (todos de Sigma), N2, 1 % de pen/estrept. (ambos de Life Technologies) de PDGF AA humano recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN). La tinción de la superficie celular se realizó a 4 °C durante 12 minutos sobre células no fijadas después de bloquear con EBSS tamponado con HEPES (E/H) con 5% de BSA. Todos los Ac humanos se usaron a 10 mg/ml. La tinción intracelular para la proteína básica de la mielina usando antisueros policlonales de ratón (Boehringer Mannheim) se realizó a temperatura ambiente tras la fijación con 4 % de paraformaldehído y permeabilización durante 5 minutos con 0,05 % de saponina. Los Ac primarios se detectaron usando Ac secundarios conjugados de forma fluorescente (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las monocapas celulares se montaron en glicerina al 90 %/PBS con 2,5 % de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano para prevenir la desaparición y 0,1 µg/ml de bisbenzimidaz (ambos de Sigma) y se vieron con un microscopio epifluorescente Olympus Provis equipado con una cámara digital SPOT (Diagnostic Instruments Inc, Sterling

Heights, MI).

Virus y Animales

La cepa Daniel de TMEV se usó para estos experimentos y se preparó como se ha descrito (32). Ratones SJL/J hembra de los Jackson Laboratories se usaron después de aclimatación de 1 semana. Se inyectó a los ratones de 4 a 6 semanas de edad por vía intracerebral 2 x 10⁵ unidades formadoras de placas de TMEV en un volumen de 10 µl tiene como resultado una incidencia superior al 98 % de infección viral crónica. Los animales usados en este estudio se emplearon de 5 a 8 meses después de la infección y recibieron una única inyección intraperitoneal de Ig o PBS. Las dosis fueron 1,0 mg de IVIC o IgM policlonal humana o 0,5 mg de los AcMo humanos. Se sacrificó a los animales a las 5 semanas después del tratamiento con Ac para la evaluación morfológica; escogidos porque los estudios en modelos tóxicos de desmielinización indican que la remielinización del SNC está casi completa en este momento (33). Se cortaron secciones de médula espinal incluidas en plástico mediante una instalación de microscopía centralizada y se retornaron al laboratorio marcado con un código numérico. De este modo, las láminas se gradúan para la remielinización de una forma enmascarada.

Transferencia de tipo western

El TMEV purificado (34) se separó mediante SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa. Después de bloquear con solución salina tamponada con Tris que contiene 5% de leche seca desgrasada y 0,05% de Tween 20 durante 2 horas a temperatura ambiente, la membrana se incubó con Ig humana (10 µg/ml) o Ac anti-TMEV policlonal de conejo (1:2000) durante 4 horas. Las Ig unidas se detectaron con AcMo anti-humanos de cabra biotinilados o anticuerpos anti-conejo de cabra biotinilados (ambos de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) y estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y azul de nitro-tetrazolio (BCIP/NBT, KPL, Gaithersburg, MD).

Cuantificación de la desmielinización/remielinización de médula espinal

Los inventores han desarrollado procedimientos para cuantificar la cantidad de desmielinización de médula espinal, remielinización y atrofia en ratones susceptibles usando secciones transversales incluidas en plástico teñidas con 4% de parafenilendiamina (PPD) para visualizar la mielina (3 5, Figura 24A). Para obtener una muestra representativa de toda la médula espinal se cortaron secciones transversales de 1 mm de espesor de cada tercer bloque en serie de 1 mm, generando de 10 a 12 secciones transversales que representan la médula espinal entera. De cada sección transversal, el área de la sustancia blanca, la patología de la sustancia blanca, la remielinización de OL y la remielinización de las células Schwann (SC) se calcularon usando el sistema de análisis digital interactivo Zeiss (ZIDAS) y una cámara lúcida unida a un fotomicroscopio de Zeiss (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY). La sustancia blanca se trazó a un aumento de 40x. Las áreas de la patología de la sustancia blanca, definida como regiones de sustancia blanca con desmielinización o remielinización, se trazaron después a un aumento de 100x. Las regiones de la patología de la sustancia blanca a menudo contenían infiltración de macrófagos, inflamación y poca o ninguna tinción PPD (Figura 25 C, D, H). La suma de las áreas de la patología que contenía desmielinización primaria con o sin remielinización se determinó como medida de desmielinización total.

Las áreas de remielinización, bien OL o SC, se trazaron a un aumento de 250x. Los OL pueden remielinizar múltiples fibras axónicas y, por tanto, la remielinización de OL en vainas de mielina densamente empaquetadas, aunque finas, en comparación con los axones mielinados normalmente. Los SC pueden remielinizar sólo una única fibra axónica, lo que tiene como resultado vainas de mielina más espesas y un incremento del espacio entre las fibras axónicas en comparación con la remielinización de los OL. Los cuerpos y los núcleos de las SC se pueden observar adyacentes a los axones que han remielinizado. Las áreas totales se calcularon para cada ratón sumando todas las áreas trazadas desde cada uno de 10 a 12 secciones de la médula espinal por ratón.

El porcentaje de área de patología de la sustancia blanca de la médula espinal por ratón se obtuvo dividiendo el área total de la patología de la sustancia blanca por el área total de la muestra de sustancia blanca. El porcentaje de área de remielinización por ratón se obtuvo dividiendo el área de la remielinización de OL o SC por el área total de la patología de la sustancia blanca. Las medidas repetidas de la patología de la sustancia blanca y la reparación extensa de la mielina revelaron valores comparables que sólo difieren en un 1,5 %. Para determinar la validez del uso de 10 secciones transversales como representación de la remielinización a través de la médula espinal, se realizó una comparación usando 10 secciones transversales frente a las 32 secciones transversales de un único ratón infectado crónicamente. El análisis de 10 secciones transversales tuvo como resultado un valor de remielinización del área en porcentaje de 47,7 %, mientras que los datos de las 32 secciones transversales tuvieron como resultado un valor del 40,0 %. Cualquier valor habría indicado una remielinización significativa en nuestro ensayo.

RESULTADOS

IVIg humana y la IgM policlonal humana estimulan la remielinización del SNC en ratones infectados por TMEV

Los estudios clínicos en EM indican que IVIg puede ser parcialmente eficaz en la estabilización del curso de la enfermedad (18,36,37). Para determinar si la IVIC humana podría estimular la remielinización en el modelo de TMEV de EM, los ratones crónicamente infectados se trataron con una única inyección intraperitoneal de 1 mg de IVIg. Se administró una única dosis para evitar provocar una respuesta inmunitaria a la Ig extraña. La dosis total de Ig humana fue de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal, un cuarto de la dosis total usada para el tratamiento con IVIg humana (18). Ratones adicionales se trataron con un único bolo de 1 mg de IgM policlonal humano. Tras el análisis de las médulas espinales, el porcentaje de área de remielinización de OL en ratones tratados con IVIg o IgM policlonal humana (Tabla 4, 14,15 % y 23,19 %, respectivamente) fue significativamente mayor que la remielinización OL espontánea observada en el grupo tratado con PBS (6,74%, $p < 0,05$ para IgG, $p < 0,01$ para IgM). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las áreas de sustancia blanca o las áreas de patología de la sustancia blanca entre cualquier grupo de tratamiento o el grupo control con PBS. Los datos describe dos experimentos independientes de tratamiento de los grupos de 7 y 9 ratones con IVIg y los grupos de 7 y 10 ratones tratados con IgM policlonal humana. Los valores finales de la Tabla 4 incluyen sólo los animales que contenían al menos un 5 % de patología de la sustancia blanca.

Tabla 4. Remielinización del SNC en ratones tras tratamiento con Ac humanos

Tratamiento	Nº de ratones	Área de sustancia blanca, mm ²	Área de patología de la mielina, mm ²	Área de remielinización de tipo SNC, mm ²	Área de remielinización de tipo SNC, %
IVIg	10	8,60 ± 0,52	0,8 ± 0,10	0,13 ± 0,02	14,15 ± 2,38*
IgM humana	14	9,70 ± 0,43	1,21 ± 0,21	0,24 ± 0,04	23,19 ± 3,26†
sHIgM 1	4	9,34 ± 1,93	0,68 ± 0,07	0,03 ± 0,01	8,35 ± 3,73
sHIgM2	4	8,78 ± 0,70	0,87 ± 0,12	0,10 ± 0,01	11,37 ± 1,30
sHIgM 14	7	11,01 ± 0,60	1,13 ± 0,18	0,08 ± 0,03	8,41 ± 2,59
sHIgM 22	8	10,55 ± 0,41	1,16 ± 0,22	0,19 ± 0,05	17,06 ± 3,42*
sHIgM46	5	9,44 ± 0,36	0,66 ± 0,06	0,18 ± 0,04	27,12 ± 4,01 ‡
PBS	7	9,78 ± 0,60	1,20 ± 0,22	0,06 ± 0,02	6,74 ± 1,80

Los valores representan la media ± SEM. Se usaron ANOVA de una vía y una prueba t para comparar el porcentaje de área de remielinización de tipo SNC en ratones tratados con anticuerpos humanos con los ratones tratados con PBS. Dichos análisis revelaron *P < 0,05; †P < 0,01, ‡P < 0,001. La comparación de los ratones tratados con otros tratamientos reveló IgM policlonal humana P = 0,05; sHIgM 46 P < 0,05. Ninguna de las demás comparaciones fue estadísticamente significativa. No se observaron diferencias en la remielinización de tipo SNC entre IgM policlonal humana, sHIgM 22 y sHIgM 46. El área de remielinización de SC de tipo de sistema nervioso periférico varió de 0 a 0,08 mm². Esto correspondió a un porcentaje de área de 0,0 a 6,92 de remielinización de SC de tipo sistema nervioso periférico como una función de la patología de la mielina. No se observaron diferencias significativas en el área de la patología de la mielina en los diversos grupos de tratamiento o en comparación con el PBS o en la remielinización de SC de tipo sistema nervioso periférico entre grupos.

El tratamiento con IgM humano policlonal tuvo como resultado más remielinización de OL que la observada en ratones tratados con IVIg ($p = 0,05$, Figura 25 A, B). Aproximadamente un cuarto del área total de la patología de mieloma se remielinizó en ratones tratados con IgM policlonal humana, que representa miles de axones envainados. De media, 1 mm² dentro de las áreas de patología remielinizadas en confluencia (Figura 25B) correspondía a 46.000 a 125.000 axones remielinizados. Por tanto, la remielinización del SNC tras el tratamiento con Ig humana fue extensa. Había pocas células inflamatorias o macrófagos. En contraste, en ratones tratados con PBS, las áreas de patología de la mielina contenían pocos axones remielinizados (Figura 25H). Había signos de destrucción activa de mielina, como remolinos de mielina, células inflamatorias y macrófagos.

Como procedimiento adicional más rápido para juzgar la eficacia de un tratamiento para estimular la remielinización, las 10 secciones de médula espinal representativas de un animal se analizaron para detectar la presencia de áreas de patología de la sustancia blanca que mostraron una reparación casi completa. Los inventores han definido la reparación completa como un área de patología de la sustancia blanca con axones remielinizados casi confluentes y sin células inflamatorias ni macrófagos (como en la Figura 25 B, F, G), un acontecimiento muy raro en la remielinización espontánea. Se observó a menos un área de reparación completa en cuatro animales tratados a menudo con IVIg y en diez de catorce animales tratados con IgM policlonal humana. Los inventores han concluido que tanto la IVIg como la IgM policlonal humana estimulan la remielinización en comparación con el tratamiento con PBS y que la IgM policlonal humana es superior a la IVIg en cuanto a su

capacidad para estimular la remielinización del SNC.

Los Ac humanos que se unen a los OL estimulan la remielinización del SNC en ratones infectados por TMEV. Todos los AcMo de ratón previamente identificados que estimulan la remielinización del SNC se unen a los OL (23, 26). Para detectar AcMo humanos para analizar en el modelo de TMEV, en los AcMo humanos se analizó la capacidad de unirse a la superficie de los OL de rata en cultivos mixtos de células glía primarias sin fijar. Los cultivos primarios establecidos a partir de cerebro de rata neonata contienen OL en varios estadios de diferenciación a los 9 días *in vitro* (38). Las fuentes de los inventores de los AcMo eran IgM monoclonales humanas derivadas de suero (sHlgMs) e IgG monoclonales humanas derivadas de suero (sHlgGs). Ninguno de 50 sHlgG se unió a OL de rata sin fijar, pero seis de 52 sHlgM se unieron a la superficie de los OL de rata marcados de forma conjunta con el AcMo anti-sulfatida 04 (39).

Los seis sHlgM de unión a OL se usaron para tratar los ratones infectados por TMEV. Los grupos de cinco animales recibieron, cada uno, una única inyección de 0,5 mg de AcMo humano. El porcentaje de área medio de remielinización de OL tras el tratamiento con sHlgM22 y sHlgM46 (Figura 25 F, G) estuvo, en ambos, significativamente por encima de los niveles de fondo atribuibles a remielinización espontánea. Los otros cuatro sHlgM de unión a OL estimularon la remielinización a niveles comparables o por debajo del nivel observado tras el tratamiento con PBS. Un segundo grupo de animales fue tratado con sHlgM22, sHlgM46 o PBS para confirmar las observaciones iniciales. SHlgM14 también se repitió como ejemplo de un AcMo humano que se unió a los OL, pero no estimuló la remielinización. Los datos combinados se presentan en la Tabla 1. Solo los animales que contenían al menos un 5 % de patología de la sustancia blanca total se incluyeron en el análisis estadístico.

El porcentaje del área más elevado de remielinización de OL se observó en los animales tratados con sHlgM46 (27,%), seguido de los animales tratados con sHlgM22 (17,%). El porcentaje del área de remielinización tras el tratamiento con sHlgM14 (8,41%) fue similar al observado tras tratamiento con PBS (6,74 %). Para analizar si cualquier sHlgM, con independencia de la especificidad antigénica, podría estimular la remielinización, los inventores estudiaron dos AcMo *in vivo*, que demostró ausencia de inmunorreactividad a los OL en cultivos primarios mixtos, sHlgM1 y sHlgM2 (Figura 25 C, D). El porcentaje del área de remielinización tras el tratamiento con sHlgM1 (8,3%), sHlgM2 (11,4%) no fue significativamente diferente de los grupos de tratamiento sHlgM14 o PBS (11,4%). En todos los grupos, las áreas de sustancia blanca y las áreas de patología de la sustancia blanca no fueron estadísticamente diferentes. En comparación con la remielinización observada en el grupo tratado con PBS, el porcentaje de área de remielinización tras el tratamiento con sHlgM46 o sHlgM22 tuvo como resultado valores $p < 0,001$ y $< 0,05$, respectivamente. El área de remielinización de SC de tipo del sistema nervioso periférico varió en los grupos de tratamiento de 0 a 0,08 mm². Esto correspondió a valores de porcentaje de área de 0,0 a 6,92 de remielinización de SC como una función de la patología de la mielina. No se produjeron diferencias estadísticas en el porcentaje de área de remielinización de SC entre cualquier grupo de tratamiento.

Comparando el porcentaje del área de remielinización de OL observada tras el tratamiento con cualquier preparación policlonal o monoclonal humana reveló que sHlgM46 era estadísticamente superior a IVIg ($p < 0,05$), pero no a IgM policlonal humana. El porcentaje del área de remielinización de OL observada tras el tratamiento con sHlgM22 no fue diferente del observado tras tratamiento con IVIg, IgM policlonal humana o sHlgM46.

Cuando se analizaron las áreas de patología de la sustancia blanca con reparación completa, se observó al menos un área en cuatro de ocho animales tratados con sHlgM22 y en cinco de cinco animales tratados con sHlgM46. En contraste con esto, ninguno de los animales tratados con sHlgM1, sHlgM2, sHlgM14 o PBS contenía una única área de reparación completa.

Los AcMo humanos, pero no las Ig policlonales humanas, se unen a los OL humanos de rata.

Si los AcMo humanos van a ser una potencial terapia para estimular la remielinización en seres humanos, una reactividad frente a los antígenos de superficie sobre los OL humanos puede ser importante para apuntar a áreas de patología del SNC humano. Por tanto, los inventores han determinado si los AcMo de estimulación de la remielinización humana podrían unirse a los OL obtenidos del cerebro humano adulto. Los cultivos de células gliales humanas se establecieron a partir de biopsias del lóbulo temporal adulto y se inmunomarcaron con los AcMo humanos en varios puntos de tiempo en el cultivo.

Tres de los seis sHlgM que se unieron a la superficie de los OL en nuestra detección selectiva inicial también se unieron a OL humanos. Tras una semana en cultivo, los OL humanos positivos para sulfatida inmaduros morfológicamente se marcaron con sHlgM14 y sHlgM46, pero no con sHlgM22. A las 3 semanas en cultivo, los OL humanos positivos para sulfatida inmaduros morfológicamente se marcaron con sHlgM14, sHlgM22 y sHlgM46 (Figura 26 A, B, C). Tras 4 semanas en cultivo, casi todos los OL humanos positivos para MBP también se unieron a sHlgM22 y sHlgM46, pero la unión de sHlgM14 se redujo considerablemente (datos no mostrados).

Ni la IVIg ni la IgM policlonal humana se unió a la superficie de OL humanos en cultivo a ninguno de los tiempos analizados. No obstante, la IgM policlonal humana se unió con fuerza a los tractos de la sustancia blanca y

varias de las poblaciones neuronales cuando se incubaron con láminas sin fijar frescas de SNC de roedores. La IVIg era completamente negativa en este ensayo de unión (datos no mostrados). sHlgM22 y sHlgM46, ambos estimularon la remielinización, y sHlgM14, que no estimuló la remielinización, también se unieron a la superficie de OL de rata positivos para la proteína básica de la mielina purificada (datos no mostrados).

Los inventores concluyeron que puede ser necesaria una afinidad por antígenos de OL, pero no es suficiente para que un AcMo humano estimule la remielinización. El hecho de que ambos AcMo humanos que estimulan una remielinización significativa se unen a OL humanos maduros diferenciados destaca el posible requisito de que los AcMo sean dirigidos a los OL adultos supervivientes para la función in vivo.

Para excluir la posibilidad de que las Ig o los AcMo humanos estimulen la remielinización neutralizando virus, en cada preparación se analizó la reactividad frente a antígenos de TMEV purificados mediante transferencia Western (34). Ninguna de las preparaciones de Ac humanos reaccionaron con las proteínas de TMEV; no obstante, la Ig policlonal de conejo producida contra el TMEV reaccionó fuertemente a cuatro proteínas de cápside viral (datos no mostrados).

Las células B periféricas se obtuvieron del individuo en el que se identificó sHlgM22. Se determinaron las secuencias de los dominios variables, cadena ligera y pesada, de sHlgM22. La región variable de la cadena ligera de sHlgM22 (número de registro en GenBank AF212992) pertenece al subgrupo I de las regiones variables de la cadena ligera humana. La región variable de la cadena pesada de sHlgM22 (número de registro en GenBank AF212993) pertenece al subgrupo III de las regiones variables de la cadena pesada humana. Se observaron diferencias significativas entre los dominios variables de sHlgM22 y la secuencia del dominio variable de la línea germinal humana más conocida (40).

DISCUSIÓN

En esta serie de experimentos, los inventores han demostrado que los Ac humanos pueden estimular la remielinización del SNC. Se observó una remielinización más extensa en las médulas espinales de ratones infectados por TMEV tras tratamiento con IgM policlonal humana que el tratamiento con IVIg humana. Además, los inventores han identificado dos IgM monoclonales humanas que potenciaron de forma consistente la remielinización. Ambos AcMo se aislaron de los sueros de pacientes con macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), una clase de linfoma caracterizado por la expansión clonal maligna de una única célula B en el último estadio de maduración que inunda el suero con IgM monoclonal (41). El nivel alto de estos AcMo no parece ser perjudicial. En pacientes con WM, la IgM dominante reconoce normalmente los antígenos que son reconocidos por el repertorio de IgM presentes en individuos sanos (42). La capacidad de los inventores para identificar fácilmente y aislar AcMo de unión a antígeno de OL que estimulan la remielinización de la población humana proporciona soporte al concepto de que estos Ac son comunes entre el repertorio de células B y pueden funcionar como modificadores en respuesta a la lesión del SNC.

Los AcMo estimuladores de la remielinización se pueden producir en los sueros de individuos cuando se confrontan con daños en el SNC.

Aunque tanto la IVIg como la IgM policlonal humana estimulaban la remielinización, ninguna se unió a los OL de rata o humanos en cultivo. En contraste con ello, ambos AcMo humanos que estimulaban la remielinización se unieron a los antígenos de superficie de OL de rata y de seres humanos. La mayor eficacia de los AcMo humanos para estimular la remielinización puede deberse a la orientación eficaz hacia los OL adultos en el área dañada. Stangel notificó que IVIg no tenía ningún efecto sobre la diferenciación, migración o proliferación de los progenitores de OL en cultivo, no obstante, la unión de IVIg a los progenitores de OL no se evaluó (43). La ausencia de afinidad de IVIg por los OL es probable que explique la falta de cualquier afección discernible en los progenitores de OOL. No obstante, el hecho de que IVIC no se une a los OL implica que el mecanismo de acción en la estimulación de la remielinización puede ser distinto del de los AcMo humanos.

La misma preparación de IgM policlonal humana usada en este estudio se ha demostrado que neutraliza los autoanticuerpos (28) y altera la expresión de citocinas en EAE (44) y que es beneficiosa en un modelo de ratón de miastenia gravis (45). La IgM policlonal humana, pero no la IVIg, se une a los tractos mielinizados en láminas no fijadas de cerebro de roedor. Ninguna preparación policlonal se unió a la sustancia blanca humana fresca. La IgM policlonal humana puede estimular una remielinización significativa en el ratón mediante una combinación de inmunorregulación general, unión a anticuerpos patogénicas y opsonización de residuos de mielina.

El mecanismo por el cual las Ig estimulan la remielinización todavía no se ha aclarado. Dado que muchos de los AcMo que estimulan la remielinización se unen a los OL y/o la mielina, es razonable postular la hipótesis de un efecto directo sobre las células reconocidas. Existen ejemplos de AcMo que se unen y alteran la biología de los OL en cultivo (46-48). No obstante, dado que los AcMo que estimulan la remielinización tienen varias especificidades (23, 26), es improbable que cada AcMo funcione directamente a través de un antígeno o receptor frecuente. Una 50 molécula polivalente como una IgM podría acercar las moléculas de señalización normalmente alejadas a las

proximidades de la membrana plasmática con la posterior activación (49). Dado que la mayoría de los AcMo que estimulan la remielinización parecen unirse a lípidos (26), la unión de estas IgM a la superficie celular podría reorganizar la membrana plasmática y facilitar una vía de señalización. Cuando se añade SCH94.03 a cultivos mixtos de células gliales primarias se observa un incremento de 2-23 veces en la captación de timidina tritiada Rodríguez, observaciones no publicadas).

Otro posible mecanismo por el cual los AcMo que estimulan la remielinización pueden funcionar es dirigiendo a los residuos de mielina o a los OL dañados. La unión a los OL o a la mielina puede potenciar la eliminación de residuos celulares de las áreas dañadas, lo que permite que progrese el proceso normal de reparación del SNC espontáneo. Quizá el mecanismo de acción de las Ig policlonales humanas es, principalmente, a través de inmunomodulación mediante una inhibición de la diferenciación de células B o una alteración de la expresión de citoquinas y la red antiidiotípica (27, 50), mientras que la acción de los AcMo humanos se produce mediante la orientación directa a los antígenos de OL y/o mielina. Ninguna característica fue completamente predictiva de la capacidad de un Ac para estimular la remielinización. De hecho, un AcMo humano analizado en ratones infectados por TMEV crónicamente para suprimir la remielinización por debajo del nivel de remielinización espontánea, lo que sugiere que ciertos AcMo humanos de unión a OL pueden inhibir la remielinización in vivo o pueden exacerbar la desmielinización. Esto es consistente con la observación de que AcMo específicos reactivos frente a los antígenos de OL (es decir, glicoproteína de oligodendrocitos de la mielina, 51) potencian la desmielinización en EAE (52). En última instancia, la prueba de un potencial de remielinización de Ac y la ausencia de patogenicidad requiere pruebas in vitro.

En varios ensayos doble ciego u controlados con placebo con IVIg humana se ha demostrado alguna eficacia en la EM (18,36,37). La IgM policlonal humana, sHIgM22 y sHIgM46 potenciaron todos ellos la remielinización del SNC en el modelo de TMEV, así como la IVIg, lo que sugiere que estos Ac pueden ser tan eficaces en la EM. Los AcMo humanos que se unen a los OL pueden tener el beneficio adicional de la estimulación directa de los OL. Los AcMo se pueden producir libres de posible infección por patógenos y se pueden alterar estructuralmente para aumentar su eficacia e inmunogenicidad. En contraste con los AcMo de ratón, o AcMo de ratón "humanizados", los AcMo humanos deberán tener como resultado una respuesta inmunitaria mínima y son aplicables fácilmente a ensayos humanos. Dado que los AcMo humanos estimulaban la remielinización en animales paralizados crónicamente, ello proporciona esperanza que se pueden desarrollar terapias satisfactorias para pacientes con discapacidades de larga data.

REFERENCIAS

1. Perier, O. & Gregoire, A (1965) Brain 88, 937-952.
2. Prineas, J.W. & Connell, F. (1979) Ann. Neurol. 5, 22-31.
3. Wolswijk, G. & Nobel, M. (1989) Development 105, 387-400.
4. Armstrong, R.C., Dorn, H.H., Kufta, C.V., Friedman, E. & Dubois-Dalcq, M.E. (1992) J. Neurosci. 12, 1538-1547.
5. Gumpel, M., Baumann, N., Raoul, M. & Jaques, C. (1983) Neurosci. Lett. 37, 307-312.
6. Warrington, A.E., Barbarese, E. & Pfeiffer, S.E. (1993) J. Neurosci. Res. 34, 1-13.
7. Groves, A.K., Barnett, S.C., Franklin, R.J., Crang, A.J., Mayer, M., Blakemore, W.F. & Noble, M. (1993) Nature 362, 453-455.
8. Franklin, R.J.M., Bayley, S.A & Blakemore, W.F. (1996) Exp. Neurol. 137, 263-276.
9. O'Leary, M.T. & Blakemore, W.F. (1997) J. Neurosci. Res. 48, 159-167.
10. Jeffery, N.D., Crang, A.J., O'Leary, M.T., Hodge, S.J. & Blakemore W.F. (1999) Eur. J. Neurosci. 11, 1508-1514.
11. McKinnon, R.D., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M., & Aaronson, S.A. (1990) Neuron 5, 603-614.
12. Bögl, O., Wren, D., Barnett, S.C., Land, H. & Noble, M. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87, 6368-6372.
13. Rosano, C., Felipe-Cuervo, E., & Wood, P.M. (1999) Glia 27, 189-202.
14. Bansal, R & Pfeiffer, S.E. (1997) J. Neurosci. Res. 50, 215-228.
15. McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T. & Gage, F.H. (1998) J. Neurosci. 18, 5354-5365.
16. Miller, D.J., Asakura, K & Rodriguez, M. (1995) J. Neurosci. Res. 41, 291-296.
17. Noseworthy, J.H., O'Brien, P.C., van Engelen, B.G. & Rodriguez, M. (1994) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 57 Suppl: 11-14.
18. Fazekas, F., Deisenhammer, F., Strasser-Fuchs, S., Nahler, G. & Mamoli, B. (1997) Lancet 349, 589-593.
19. Lucchinetti, C.F., Bruck, W., Rodriguez, M. & Lassmann, H. (1996) Brain Pathol. 6, 259-274.
20. Dal Canto, M.C. & Lipton, H.L. (1997) Am. J. Pathol. 88, 497-500.
21. Drescher, K.M., Rivera-Quinones, C., Lucchinetti, C. & Rodriguez M. (1998) J. Neuroimmunol. 88, 111-119.
22. Miller, D.J., Sanborn, K.S., Katzmann, J.A. & Rodriguez, M. (1994) J. Neurosci. 14, 6230-6238.
23. Asakura, K., Miller, D.J., Murray, K., Bansal, R, Pfeiffer, S.E. & Rodriguez, M. (1996) J. Neurosci. Res. 43, 273-281.
24. Pavelko, K.D., van Engelen, B.G. & Rodriguez, M. (1998) J. Neurosci. 18, 2498-2505.
25. Miller, D.J., Bright, J.J., Sriram, S. & Rodriguez, M. (1997) J. Neuroimmunol. 75, 204-209.

26. Asakura, K., Miller, D.J., Pease, L.R. & Rodriguez, M. (1998) *J. Neurosci.* 18, 7700-7708.
27. Dwyer, J.M. (1992) *N. Engl. J. Med.* 326, 107-116.
28. Hurez, V., Kazatchkine, M.D., Vassilev, T., Ramanathan, S., Pashov, A., Basuyaux, B., de Kozak, Y., Bellon, B. & Kaveri, S.V. (1997) *Blood* 90, 4004-4013.
- 5 29. Gard, A.L. & Pfeiffer, S.E. (1989) *Development* 106, 119-132.
30. Asakura, K., Hunter, S.F. & Rodriguez, M. (1997) *J. Neurochem.* 68, 2281-229035.
31. Hunter, S.F. & Bottenstein, J.E. (1991) *J. Neurosci. Res.* 28, 574-583.
32. Rodriguez, M., Leibowitz, J.L. & Lampet, P.W. (1983) *Ann. Neurol.* 13, 426-433.
33. Blakemore, W.F., Eames, R.A., Smith, K.J. & McDonald, W.I. (1977) *J. Neurol. Sci.* 33,
- 10 34. Njenga, M.K., Pavelko, K.D., Baisch, J., Lin, X., David, C., Leibowitz, J. & Rodriguez, M. (1996) *J. Virol.* 70, 1729-1737.
35. McGavern, D.B., Murray, P.D. & Rodriguez, M. (1999) *J. Neurosci. Res.* 58, 492-504.
36. Achiron, A., Pras, E., Gilad, R., Ziv, I., Mandel, M., Gordon, C.R., Noy, S., Sarova-Pinhas, I. & Melamed, E. (1992) *Arch. Neurol.* 49, 1233-1236.
- 15 37. Sorensen, P.S., Wanscher, B., Jensen, C.V., Schreiber, K., Blinkenberg, M., Ravnborg, M., Kirsmeier, H., Larsen, V.A. & Lee, M.L. (1998) *Neurology* 50, 1273-1281.
38. Pfeiffer, S.E. (1984) in *Oligodendroglia*, ed. Norton, W.T. (Plenum, New York), pp. 233-298.
39. Sommer, I. & Schachner, M. (1981) *Devel. Biol.* 83, 311-327.
40. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, 5^a ed. (Publicación del NIH, Bethesda, MD).
- 20 41. Kyle, R.A. & Garton, J.P. (1987) *Mayo Clin. Proc.* 62, 719-731.
42. Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Pashov, A., Barreau, C., Kaveri, S.V. & Kazatchkine, M.D. (1997) *Intl. Immunol.* 8, 1175-1183.
43. Stangel, M., Compston, A. & Scolding, N.J. (1999) *J. Neuroimmunol.* 96, 228-233.
- 25 44. Pashov, A., Bellon, B., Kaveri, S.V. & Kazatchkine, M.D. (1997) *Mult. Scler.* 3, 153-156.
45. Vassilev, T., Yamamoto, M., Aissaoui, A., Bonnini, E., Berrih-Aknin, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29, 2436-2442.
46. Bansal, R. & Pfeiffer, S.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6181-6185.
47. Dyer, C.A. & Benjamins, J.A. (1990) *J. Cell Biol.* 111, 625-633.
- 30 48. Cohen, J.A., Williams, W.V., Geller, H.M. & Greene, M.I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1266-1270.
49. Bansal, R., Winkler, S. & Bheddah, S. (1999) *J. Neurosci.* 19, 7913-7924.
50. Stangel, M., Toyka, K.V. & Godl, R. (1999) *Arch. Neurol.* 56, 661-663.
51. Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombrail, P. & Boutry, J-M. (1986) *Clin. Exp. Immunol.* 66, 423-443.
- 35 52. Genain, C.P., Nguyen, M.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, M., Lees, M.B., Linington, C. & Hauser, S.L. (1995) *J. Clin. Invest.* 6, 2966-2974.

EJEMPLO 4

40 Como se ha descrito en los Ejemplos anteriores, los inventores han usado dos enfoques para identificar anticuerpos monoclonales humanos que inducen un patrón similar de remielinización en el modelo de virus de Thelie de enfermedad desmielinizante. El primer abordaje fue transformar las células B humanas con el virus de Epstein Barr (EBV) para generar clones de células B secretoras de inmunoglobulina. Las líneas celulares resultantes se sometieron a detección selectiva para identificar cultivos que expresaban niveles altos de anticuerpos y la

45 estabilidad de los anticuerpos producidos para unirse a antígenos del SNC, con énfasis concreto sobre aquellos que se unían a oligodendrocitos. El segundo abordaje fue realizar una detección selectiva similar de la unión al SNC de suero de pacientes diagnosticados con una gammopatía monoclonal, tal como MUGUS, linfoma o síndrome de Waldenstrom. En el caso de las células transformada por EBV, las propias células podrían proporcionar una fuente de anticuerpo para generar cantidades suficientes de anticuerpos de calidad GMP para ensayos clínicos. Además, los anticuerpos identificados de cualquier fuente podrían producirse más óptimamente en un sistema productor de anticuerpos artificiales usando genes del anticuerpo sintéticos que codifican los anticuerpos de interés. Los inventores prevén que las líneas celulares de hibridoma transfeccionadas con un casete de expresión de anticuerpo que codifican el anticuerpo de interés proporcionarán suficiente anticuerpo de interés para el análisis in vivo y en ensayos clínicos.

55 En el curso de los estudios de detección selectiva, los inventores han identificado un grupo de anticuerpos IgM monoclonales humanos que inducen remielinización estadísticamente significativa en su modelo de virus de Thelie in vivo de enfermedad desmielinizante (TABLA 5). Cada uno de estos anticuerpos imitaron la respuesta de remielinización descrita originalmente con el anticuerpo monoclonal murino prototipo SCH 94.03. Entre estos anticuerpos humanos son dos derivadas de líneas de células B transformadas con EBV, denominados MSI 19D10 y

60 CB2bG8, y dos anticuerpos, denominados sHIgM 22 y sHIgM 46, identificados entre un pan de anticuerpos de más de 50 pacientes que expresan niveles altos de IgM monoclonal en su suero.

TABLA 5. Remielinización inducida por anticuerpos monoclonales humanos en ratones SJL/J infectados crónicamente con el virus de Theiler.

Tratamiento	% Remielinización	Evaluación estadística
Comparación 1		
PBS (n=7)	6,74 (+/-1,80)	
sHIgM 22 (n=8)	17,6 (+/-3,42)	P<0,05
sHIgM 46 (n=5)	27,12 (+/-4,01)	P<0,001
Comparación 2		
PBS (n=12)	8,25 (+/-1,44)	
MSI 19-D10 (n=13)	24,38 (+/-2,91)	P<0,001
CB2b-G8 (n=12)	23,51 (+/-3,13)	P<0,001
Los animales se infectaron crónicamente con la cepa DA del virus de Theiler durante más de 9 meses antes del tratamiento con una única inyección ip de 0,5 mg de anticuerpo IgM aislado del suero del paciente (sHIgM22 y sHIgM 46) o líneas celulares transformadas con EBV (MSI 19-D10 o CB2b-G8). Cinco semanas después, los ratones fueron perfundidos con agente de fijación y médulas espinales para análisis histológico. Las áreas de desmielinización y remielinización se evaluaron directamente mediante microscopia. El porcentaje de área de remielinización se determinó mediante la fórmula $\text{área remielinizada} / \text{área desmielinizada} \times 100$. Los efectos del tratamiento se evaluaron mediante comparación estadística con los grupos de animales que recibieron inyecciones de PBS en lugar de anticuerpo,		

Los animales se infectaron crónicamente con la cepa DA del virus de Theiler durante más de 9 meses antes del tratamiento con una única inyección ip de 0,5 mg de anticuerpo IgM aislado del suero del paciente (sHIgM22 y sHIgM 46) o líneas celulares transformadas con EBV (MSI 19-D10 o CB2b-G8). Cinco semanas después, los ratones fueron perfundidos con agente de fijación y médulas espinales para análisis histológico. Las áreas de desmielinización y remielinización se evaluaron directamente mediante microscopia. El porcentaje de área de remielinización se determinó mediante la fórmula $\text{área remielinizada} / \text{área desmielinizada} \times 100$. Los efectos del tratamiento se evaluaron mediante comparación estadística con los grupos de animales que recibieron inyecciones de PBS en lugar de anticuerpo,

Las estructuras de las cadenas ligera y pesada de la IgM para ambos anticuerpos derivaron de los transformantes con EBV se han determinado mediante análisis de ADNc generado a partir del ARNm de inmunoglobulina aislado de las células. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de MSI 19D10 y sHIgM 22 se proporcionan en las Figuras 19 y 20 (SEC ID N° 9 y 11) y las Figuras 17 y 18 (SEC ID N° 1, 49, 5 y 50), respectivamente. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de CB2bG8 se proporcionan en las Figuras 27 y 28 (SEC ID N° 13 y 15). Las propias secuencias no son destacables en otro sentido aparte de que difieren algo con respecto a las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal conocida. Por tanto, pueden ser los productos de la diversificación somática durante el curso de las respuestas inmunitarias contra antígenos no identificados. El valor de las secuencias es que proporcionan una impresión azul para la construcción de vectores de expresión para la producción de la inmunoglobulina en conducciones controladas.

De forma similar, las estructuras de las cadenas pesada y ligera del suero de uno de los pacientes productores de IgM se determinaron mediante análisis de la secuencia de proteínas, seguido de clonación y análisis de la secuencia de ADNc de células mononucleares de sangre periférica aisladas del paciente. En el suero del paciente se identificaron dos cadenas pesada y ligera estrechamente relacionadas, denominadas sHIgM22 (Figuras 17 y 18). Las dos cadenas ligera y pesada estaban presentes en las poblaciones de ADNc aislado en una proporción de 60:40. Ambos anticuerpos comparten una reorganización P-VDJ común y una reorganización -VJ, lo que indica que derivan de un precursor de células B común. Después, han divergido como resultado de la acumulación de mutaciones que han alterado las estructuras de sus regiones variables. Los inventores han concluido que los anticuerpos se expresan en el suero del paciente porque los péptidos de los anticuerpos se caracterizaron a partir de la proteína aislada de suero. No obstante, las dos combinaciones distintas de cadenas variable y ligera no se observaron directamente, dejando abierta la posibilidad de que otras combinaciones de las cadenas alfa pueden estar realmente presentes. En base a las posiciones de las sustituciones de aminoácidos observadas, los inventores sospechan que los anticuerpos tienen patrones de reactividad muy similares.

EJEMPLO 5

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSFECCIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE GENES DE ANTICUERPOS

EN CULTIVO CELULAR

Con el fin de generar un suministro renovable de títulos elevados de anticuerpos de los anticuerpos humanos, los inventores han desarrollado un sistema de expresión basado en la transfección. Las células de

Los inventores han explorado el uso de una serie de sistemas vectores basados en genoma y ADNc para expresar los genes de anticuerpo clonados en cultivo celular. Los inventores han expresado con éxito la proteína de cadena ligera usando genes genómicos o basados en ADNc. Los inventores han conseguido la expresión de la cadena pesada usando un vector de la cadena pesada basado en el genoma PAG 4026 (amablemente proporcionado por la Dra. Sherie Morison de la UCLA). No obstante, el rendimiento de anticuerpo con este sistema de vector es demasiado bajo para su uso práctico in vivo. El objetivo de los inventores ha sido desarrollar un vector nuevo que dará de forma rutinaria clones de hibridoma transfeccionados que producen un título alto de anticuerpos. La estrategia actual de los inventores es ensamblar el vector a partir de componentes e individualmente se ha demostrado que funcionan bien en sus manos.

Los inventores han mostrado que un vector que expresa dHfr y el ADN de la cadena ligera de inmunoglobulina bajo el control del promotor de CMV expresa la cadena ligera y que esta expresión se puede amplificar cultivando las células productoras de inmunoglobulina transfeccionadas en concentraciones crecientes de metotrexato (Figura 29). A continuación, los inventores clonan esta unidad funcional, que expresa la cadena ligera de inmunoglobulina y dHfr, en el vector que expresa el gen de la cadena pesada genómica que codifica la cadena complementaria. El primer vector que han creado los inventores en este sentido, codifica 94.03 quimérico de ratón/humano 94.03 y se muestra en el panel superior de la Figura 30. El vector se ha introducido en células de hibridoma negativas a anticuerpo y clones que expresan cantidades pequeñas de anticuerpo funcional. El anticuerpo tiñe el tenido del SNC de un modo idéntico al que usa el anticuerpo 94.03 nativo de ratón (Figura 3.1)- Estos clones productores de anticuerpos sufren selección con cantidades crecientes de metotrexato para expandir la cantidad de anticuerpo que se está produciendo. Dado que los inventores han identificado dos cadenas pesada y dos ligeras en el suero humano de SHIGM 22, las cuatro permutaciones de la cadena pesada y ligera se tienen que evaluar. Los vectores que expresan tres de las cuatro posibles combinaciones de sl-ngm 22 identificados en nuestro estudio de secuencia y actualmente se introdujeron en las células de hibridoma negativos para inmunoglobulina. El vector prototipo se muestra en el panel inferior de la figura 30.

PROCEDIMIENTOS

Construcción de los vectores de expresión para expresar 94.03 (M1) quimérico de ratón/de rata y el anticuerpo sHlgM-22:

Ensamblaje del sistema de expresión para 94.03 quimérico de ratón/de rata

El vector ensamblado consta de dos unidades. El primero codifica la cadena pesada de la inmunoglobulina que está codificada por un gen de inmunoglobulina derivado de ADN genómico. El vector es, en parte, un derivado de un vector armazón (PAG 4026) obtenido del laboratorio de la Dra. Sherrie Morrison de UCLA. El vector PAG 4026 codificado por una cadena pesada de IgM que expresa una región variable irrelevante. No se disponía de sitios de clonación cómodos para la sustitución de regiones variables de interés. Por tanto, los inventores obtuvieron la ingeniería mediante delección de las secuencias de cadena pesada irrelevantes y reconstitución de las regiones que flanquean la región variable con sitios de restricción únicos (Rsr II en el extremo 5' y Pac I en el extremo 3'). Dado que la secuencia del vector PAG no se conocía, los inventores han determinado qué enzimas de restricción serían únicas por el método de prueba y error, cuando enzimas que reconocen secuencias con poca frecuencia presentes en el ADN de mamífero.

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal IgM de ratón 94.03 se aisló a partir de ADNc mediante PCR usando el cebador RsrII

ACTCCCAAGTCGGCTCGCTTTCTCTTCAGTGACAAACACAGACATAGAACA TCACCATGGGATGGAGCTGT-ATCACT (SEC ID N°: 39) para introducir el sitio RsrII antes en la cadena de la secuencia líder y el cebador PAcI ACTGACTCTCTTAATTAAGACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT (SEC ID N° 40) para introducir el sitio PacI manteniendo la correcta unión de corte y empalme en el extremo 3' del bloque de codificación de la región variable.

La segunda parte del vector de expresión deriva de múltiples plásmidos. La construcción terminada contiene sitios EagI en ambos extremos, la secuencia de codificación DHFR (dihidrofolato reductasa) bajo el control regulador del promotor de SV40 y un bloque de codificación de ADNc de cadena ligera kappa humana/quimérico de ratón bajo el control regulador del promotor sdl CMV. Esta porción del vector se ensambló de un modo por etapas, comenzando con tres plásmidos (pCIneo (Promega Corporation), pUC18 (New England Biolabs), and pFR400

(Simonsen and Levinson, Proc Natl Acad Sci USA 80:2495: 1983)) que proporcionó sitios de clonación adecuados, regiones promotoras, señales de poliadenilación y/o el bloque de codificación DHFR. Después de una serie de modificaciones que incluyó la introducción de regiones de unión sintéticas y, por tanto, los sitios de endonucleasa de restricción no deseables, el casete de expresión de metotrexato mediante un casete de luz., se ensambló. EL casete incluye sitios para endonucleasa de restricción únicas (Nhe I y Xho I) que flanquea el bloque de ADN c del gen de la cadena ligera.

El gen de la cadena ligera quimérica se ensambló a partir de dos secuencias de ADN usando el corte y empalme de PCR mediante la técnica de extensión de solapamiento (Horton y col.) Gene 77:61:1989). Los cebadores que flanquean las regiones fusionadas del ADNc quimérico (que contenían las secuencias de reconocimiento enzimático para las endonucleasas Xho I y Nhe I. El cebador en 5' usado para amplificar el producto del gen fusionado fue TTGGCGCGCCAAAGACTCAGCCTGGACATGATGTCCTCTGCTCAGTTC (SEC ID N° 41); el cebador en 3' fue ATAGTTTAGCGGCCGATTCTTATCTAACACTCTCCCCTGTTG (SEC ID N° 42). El bloque de codificación de ADNc se insertó en el vector del casete de la cadena ligera usando estos sitios.

Una vez ensamblado, el casete se escindió usando la endonucleasa Eag I y se insertó en el sitio Eag I único en el vector que contiene el gen de la cadena pesada. La construcción resultante contiene las secuencias de codificación para los componentes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico de ratón/humano para 94.03 "humanizado". La cadena pesada se expresa mediante el promotor de IgH humano y la cadena ligera se expresa mediante el promotor del CMV. El gen de dhfr proporciona un marcador de amplificación y se expresa mediante el promotor del SV40. Cada uno de estos genes contiene señales de poliadenilación en los extremos 3'. Otras características importantes del vector incluyen un origen bacteriano de replicación y un gen expresado en bacterias que codifica resistencia a ampicilina. Los bloques de codificación de ADN de la región variable de las cadenas ligera y pesada están flanqueados por sitios únicos de endonucleasas de restricción que se pueden usar para sustituir nuevas secuencias de inmunoglobulina aisladas de ARNm de cualquier célula productora de anticuerpo o genes de inmunoglobulina sintéticos.

Inserción de las secuencias de sI-HgM.22 en el sistema del vector de expresión

El ADNc del ARNm que codifica las cadenas pesada y ligera de sHlgM.22 se preparó mediante amplificación por PCR del ARN de sangre periférica usando cebadores en 5' deducidos de la información sobre la secuencia de aminoácidos y secuencias en las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera respectivamente. El bloque de codificación de la región variable de la cadena pesada, la secuencia líder y la unión de corte y empalme del donante, junto con los sitios flanqueantes de RsrII y Pac I se ensamblaron usando PCR para añadir la región 5' GACTCGGTCCGCCCAGCCACTGGAAGTCGCCGGTGTTCATTCCGTTGATCATCACTGAACACAGAGG- ACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGC- AGCTGGTGGAGTCT GG (SEC ID N° 43) y las secuencias en 3' CCTTAATTAAGACCTGGAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACCAG GGTTC (SEC ID N° 44). La molécula de ADN resultante se digirió con Rsr II y Pac I, y después se clonó en el vector de expresión, sustituyendo la secuencia de la región variable deseada para la secuencia irrelevante en el vector.

La secuencia de la cadena ligera se ensambló en dos etapas. La región constante lambda se aisló del ARNm mediante PCR-RT usando el cebador en 5' CTAGCTAGCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC (SEC ID N° 45) y el cebador en 3' ATAGTTTAGCGGCCGCACCTATGAACATTCTGTAGG (SEC ID N° 46). Este fragmento se clonó usando un único sitio AvrII y un sitio en 3' Not I en el vector pCIneo.

La región variable de sHlgM.22 se generó mediante PCR-RT usando el cebador en 5' CTAGCTAGCCCGAATTCGGGACAATCTTCATCATGACCTGCTCCCCTCTC CTCCTCACCCTTCTCATT- CACTGCACAGGGTCTGCGGCCAGTCTGTGTTG ACGCAGCCG (SEC ID N° 47) con el fin de introducir la necesidad del sitio Nhe I y la secuencia líder sobre el ADN. El cebador en 3' GGGCAGCCTTGGGCTGAGCTAGGACGGTCAGC (SEC ID N° 48) se usó para introducir un sitio AvrII de modo que este fragmento podría unirse con la pieza de la región constante. El bloque de codificación resultante que contiene una señal líder funcional estaba flanqueado por los sitios NheI y Xho I necesarios para clonar en el casete de la cadena dhfr^{neg}, que después se ensambló con el plásmido de la cadena pesada para generar el producto final que contiene las secuencias de codificación tanto de la cadena pesada como de la ligera y los promotores necesarios para la expresión en células de mamífero.

EJEMPLO 6

ANTICUERPO 94.03 DE ISOTIPO IgG

Una estrategia para determinar la importancia del isotipo en la capacidad del anticuerpo de ratón 94.03 para inducir remielinización es generar un anticuerpo recombinante que expresa la región variable de 94.03 con un isotipo IgG. Como estrategia alternativa, los inventores han buscado identificar una variante de desplazamiento del isotipo natural dentro de la población de las células productoras de 94.03 en cultivo. Se sabe que las variantes de

desplazamiento espontáneo aparecen en los cultivos de este tipo. Tras clasificaciones sucesivas en FACS de las células teñidas para la IgG de superficie celular, los inventores capaces de aislar una línea de células clonales que secretan 94.03 portadoras del isotipo IgG1 (Figura 32). La estructura del anticuerpo producida por estas células se confirmó mediante ELISA, caracterización de las proteínas producidas en geles de SDS y mediante clonación del ADNc. El análisis directo de la secuencia como se indica en la Figura 33 produjo datos definitivos que indicaban que los inventores han descubierto una variante de IgG del anticuerpo 94,03.

EJEMPLO 7

ANTICUERPO 09 DE RATÓN ANTI-OLIGODENDROCITOS DE ISOTIPO IGG3.

El anticuerpo 09 de ratón se aisló como anticuerpo anti-oligodendrocito y es del subtipo IgG3 (Kuhlmann-Krieg, S., Sammer, 1. y Shachner M. (1988) Devel Brain Res 39:269-280). El anticuerpo 09 se une fuertemente y específicamente a la sustancia blanca en el SNC. Los inventores han analizado y demostrado la capacidad del anticuerpo 09 para estimular la remielinización en el modelo de TMEV (datos no mostrados). La secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 09 se proporciona en la Figura 34 (SEC ID N° 17). La secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 09 se proporciona en la Figura 35 (SEC ID N° 19). La secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 09 se proporciona en la Figura 36 (SEC ID N° 21).

EJEMPLO 8

LOS MONÓMEROS DE IgM INDUCEN REMIELINIZACIÓN

Otro abordaje para descifrar la importancia de las características estructurales de los anticuerpos IgM para la inducción de remielinización es fraccionar el anticuerpo bioquímicamente y evaluar la capacidad de los fragmentos de anticuerpo para inducir la remielinización in vivo. Una posibilidad es que los anticuerpos identificados tengan una afinidad baja por las estructuras del SNC, y, por tanto, la decavalencia de la IgM puede ser crucial para remielinizar la actividad porque los múltiples sitios de unión proporcionan suficiente avidéz por los anticuerpos de modo que interaccionan con las estructuras diana en el SNC. Para abordar esta cuestión, los inventores han generado monómeros de IgM mediante reducción de los puentes disulfuro que sujetan las moléculas de inmunoglobulina pentamérica. Los monómeros resultantes son divalentes. Los monómeros no se unen a los oligodendrocitos in vitro y no tiñen secciones cerebrales en el patrón observado con el anticuerpo nativo intacto. No obstante, los anticuerpos monoméricos conservan la capacidad para inducir la remielinización (Tabla 6). Este fue un resultado sorprendente a la luz de la ausencia de tinción observada en nuestros ensayos in vitro. Una posibilidad es que los ensayos in vitro que controlan la unión no son tan sensibles como el bioensayo de remielinización. Dado que hay una correlación tan fuerte entre la unión y la inducción de remielinización, los inventores creen que la especificidad de estos anticuerpos por las estructuras del SNC es importante a pesar de nuestra incapacidad para seguir la unión con los monómeros.

Tabla 6. Remielinización inducida por fragmentos monoméricos de AcMo de IgM 94.023.

Tratamiento	% Remielinización	Evaluación estadística
PBS (n=7)	6,74 (+/-1,80)	
94,03 monomérico (n= 8)	17,32 (+/-2,67)	P<0,01
94,03 pentamérico (N= 5)	18,1 (+/-5,76)	P<0,01
Los anticuerpos IgM se redujeron en condiciones suaves y se alquilaron. Este tratamiento rompió la estructura pentamérica de los anticuerpos y permitió aislar los monómeros divalentes mediante cromatografía en columna. Ratones SJL/J crónicamente infectados recibieron un total de 0,5 mg de anticuerpo administrado ip dos veces a la semana durante el periodo de tratamiento de cinco semanas. Cinco semanas después, los animales fueron perfundidos con agente de fijación y las médulas espinales se extrajeron para análisis histológico. El porcentaje de área de remielinización se determinó microscópicamente mediante comparación de las lesiones remielinizadas y el área desmielinizado total como se indica en la Tabla 5. Los grupos de tratamiento individual se compararon con los animales que recibieron inyecciones de PBS en lugar de anticuerpo.		

Además, el anticuerpo se fraccionó generando (Fab')₂ Fab, y fragmentos de Fv del anticuerpo. Ratones SJL infectados crónicamente con el virus de Theiler con estos fragmentos de anticuerpo para determinar si los fragmentos divalentes ausentes en la porción de Fc o fragmentos de anticuerpo monovalentes o de anticuerpos.

Un análisis paralelo del anticuerpo monoclonal humano sHlgM 22 se realiza para determinar si los fragmentos de anticuerpo de esta IgM humana se comportan de forma similar. Se puede determinar que un solo dominio de unión pequeño puede inducir remielinización, esta información puede ser importante para determinar el

mecanismo de reparación, así como para proporcionar una vía para el desarrollo de un análogo farmacológico.

EJEMPLO 9

EL ANTICUERPO sHIgM 46 INDUCE REPARACIÓN DE LA MIELINA

Nuestros estudios iniciales sugieren que la inducción de la reparación de la mielina por sHIgM 46 puede ser cualitativamente superior a la reparación observada con sHIgM 22. Tras el análisis histológico de las secciones de ratones SJL crónicamente infectados por TMEV, se observaron áreas más pequeñas de desmielinización tras el tratamiento con sHIgM 46 que con otros anticuerpos monoclonales (Tabla 7). Esta observación fue altamente estadísticamente significativa. Este resultado es notable por el tratamiento con el anticuerpo no comienza hasta que las lesiones desmielinizadas están bien establecidas y han alcanzado un tamaño máximo en animales infectados crónicamente. La interpretación de los inventores de este resultado es que la reparación de la mielina es tan completa en algunas áreas de la médula espinal que no se están distinguiendo de áreas normales de la médula durante nuestro análisis histológico estándar. Las lesiones en ratones tratados con sHIgM 46 se analizan mediante microscopía electrónica para confirmar si las lesiones reparadas contienen números de envoltas de mielina más altos que en otros grupos de tratamiento

Tabla 7. Diferencias cualitativas en la reparación de la mielina por el anticuerpo humano sHIgM 46

Tratamiento	% de sustancia blanca desmielinizada	Evaluación estadística
sHIgM46 (n=15)	4,07 (+/-2,52)	
Los demás anticuerpos (n= 70)	10,41 (+/-6,26)	P<0,001

Los ratones SJL/J crónicamente infectados con el virus de Theiler durante más de 9 meses se dividieron en grupos y cada grupo individual recibió una única inyección ip de 0,,5 mg de una de una batería de anticuerpos monoclonales. Cinco semanas después, los animales fueron perfundidos con agente de fijación y las médulas espinales se aislaron para su análisis histológico. El área de desmielinización se determinó midiendo el área total de la médula ocupada por sustancia blanca y el área de desmielinización visualizada mediante microscopía óptica usando una óptica de 25 X. Los datos están compuestos por los de los ratones de tres experimentos independientes. Los anticuerpos usados para tratar a los animales en el grupo de tratamiento combinado ("todos los demás anticuerpos") fueron IgM sHIgM 12,'14, 22, 47, 50, AKJR8, MSI 10E10, 2B2GE7, NA8FE4 monoclonales humanos, y los anticuerpos 06, 09, RIP, y MOG de ratón. El conjunto de datos pasó las pruebas de normalidad y se analizaron mediante ANOVA.

EJEMPLO 10

Se determinaron las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanos AKJR44, CB2iE12 y CB2iE7, y la región variable de la cadena ligera de MSI19E5. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de AKJR4 se muestran en las Figuras 37 y 38, respectivamente (SEC ID N° 23 y 25). Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de CB2iE12 se muestran en las Figuras 39 y 40, respectivamente (SEC ID N° 27 y 29). Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de CB2iE7 se muestran en las Figuras 41 y 42, respectivamente (SEC ID N° 31 y 33). La secuencia de la región variable de la cadena ligera de MSI19E5 se muestra en la Figura 43, respectivamente (SEC ID N° 35).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH Rodriguez, Moses Miller, David J.Pease, Larry R.

<120> HUMAN IGM ANTIBODIES AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USES THEREOF PARTICULARLY IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

<130> 1199-1-006CIP PCT

<140> EP 00948498.1

<141> 2000-05-30

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.0

ES 2 531 552 T3

<210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Val Thr Gly Ser Pro Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaggagtg 300
 actgctattc cctactttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357
 <210> 3
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggggggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctctggca tgcactgggt ccgccaagct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttcatatg atggaagtag gaaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cactctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgac ggctgacgac acggctgtgt attattgtgc gaaaggagtg 300
 actggtagtc cgacgcttga ctactggggc cagggagccc tggtcaccgt ctcctca 357
 <210> 4
 <211> 357
 <212> ADN

ES 2 531 552 T3

<213> Homo sapiens

<400> 4

5 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctctggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatc atttcatatg atggaagtac gaaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cactctctat 240
 10 ctgcaaataga acagcctgac agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaggagtg 300
 actggtagtc cgacgcttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcg 357

<210> 5

<211> 114

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

45 <211> 337

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

50 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgtctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
 ccaggaaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
 55 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgtg tggatttcgg 300
 cggaagggacc aagctgaccg tcctaggtca gcccaag 337

<210> 7

<211> 342

60 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

65

ES 2 531 552 T3

5 cagtctgtgt tgacggagcc gccttcagtg tctgctgccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattggc aataattttg tctcctggta ccagcaactc 120
 ccaggaacag ccccccagact cctcatttat gacattacta agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctgtggta 300
 ttcggcgggg ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca ag 342

10 <210> 8
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 cagtctgtgt tgacggagcc gccttcagtg tctgctgccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattggc aataattttg tctcctggta ccagcaactc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacattacta agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
 20 actggggacg aggccgatta ttactgcgaa acatgggata gcagcctgag tgctgtggta 300
 ttcggcgggg ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca ag 342

25 <210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

35 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

40 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

45 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

50

55

60

65

ES 2 531 552 T3

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

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120

10 <210> 10
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

15 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacab ccagttctcc 240
 20 ctgaagctga gctctgtgac cgctgcggac acggccabcg tgtattactg tgcgaggtcg 300
 gcacagcagc agctggtata ctacdtttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt 360
 ctctcagggy 370

25 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

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

35 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

40 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

45 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

50 Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

55 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 115

60 <210> 12
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

65

ES 2 531 552 T3

```

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgtg ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttctactgggc atctaccggg 180

5  gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
   atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
   cctctcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac gaactgtggc tgcacca 357

<210> 13
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.

<400> 13

   Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Val Gln Pro Gly
   1          5          10          15

   Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser
          20          25          30

   Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys
          35          40          45

   Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Xaa
          50          55          60

   Xaa Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
          65          70          75          80

   Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
          85          90          95

   Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Ser Gly Trp
          100          105          110

   Tyr Trp Ser Cys Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser
          115          120          125

   Ser

<210> 14
<211> 387
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.

<400> 14

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnagnnn gccgtgggtcc agcctgggag gtccctgaga 60
ctctcctgtg cagcgtcttg attcattttc agtagctatg gcnnnnnnnn nnnnatgcac 120
tggggtccgcc aggttccagg caaggggctg gagtgggtgg cagttatatg gtatgatgga 180
agtgataaan nnnnntacta tgtagactcc gtgaagnnng gccgattcac catctccaga 240
gacaattcta aaaacacgct ctatctgcaa atgaacagcc tgagagccga ggacacggct 300
gtgtattact gtgcgagaga tcgcagcagt ggctgggtact ggtcctgcga ctctctggggc 360
caggggaaccc tggtcattgt ctcctca 387

```

<210> 15
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 <400> 15
 10
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Leu Ser Gly Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 15
 Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Asn Tyr Xaa Xaa Xaa Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 35 40 45
 20
 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 25
 Xaa Asp Arg Pro Ser Gly Val Ser Xaa Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala
 85 90 95
 30
 Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 115 120 125
 35
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Pro Xaa
 130 135 140
 40
 <210> 16
 <211> 421
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 <400> 16
 50
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt tngcctcnnn ctgtctgggt ctctctggaca gtcgatcacc 60
 atctccctga ctggaaccag cagtgcggtt ggtggttata actatnnnnn nnnngtctcc 120
 tggtaaccaac agcaccacagg caaagccccc aaactcatga tttatgatgt cagttnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnngatcg gccctcagggt gtttctnnna atcgcttctc tggctccaag 240
 nnnnnntctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga ggacgaggct 300
 55
 gattattact gcagctcata tacaagcagc agctctgtgg tattcggcgg agggaccaag 360
 ctgaccgtcc taggtcagcc caaggctgcc ccctcgggtca ctctgttccc gcctccaang 420
 g 421
 60
 <210> 17
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 65
 <220>

ES 2 531 552 T3

<223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.

<400> 17

5	Gln	Asp	His	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Xaa	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Ala	Phe	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn
10				20					25					30		
	Tyr	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln
			35					40					45			
15	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Thr	Xaa
	50						55					60				
	Xaa	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Xaa	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala
	65					70					75					80
20	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Leu	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser
					85					90					95	
	Glu	Ser	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Pro	Arg	Gly	Trp
25				100					105					110		
	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
			115					120					125			

30

<210> 18

<211> 384

<212> ADN

<213> Mus musculus

35

<220>

<223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.

<400> 18

40

	caggatcacc	tgcagcagtc	tggacctnnn	gagctggtga	agcctggggc	ttttgtgaag	60
	atatacctgca	aggcttctgg	ttacaccttc	acaaactacg	atnnnnnnnn	nnnnctaaac	120
	tgggtgaggc	agaggcctgg	acagggcctt	gagtggtattg	gatggattta	tcctggaaat	180
45	gataatactn	nnnnnaagta	caatgagaag	ttcaagnnng	gcctggcctc	actgactgca	240
	gacaagtcct	ccaccacagc	ctacttgcat	ctcagcagcc	tgacttctga	gagctctgca	300
	gtctatttct	gtgcaagagg	gttacctagg	ggctggtact	tcgatgtctg	gggcgcaggg	360
	accacggtca	ccgtctcttc	agct				384

50

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

55

<220>

<223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.

<400> 19

60

65

ES 2 531 552 T3

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln
 35 40 45
 10 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 15 Xaa Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Xaa Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 85 90 95
 20 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 100 105 110
 25 Thr Phe Gly Gly Gly
 115
 <210> 20
 <211> 351
 <212> ADN
 30 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 35 <400> 20
 aacattgtaa tgacccaatc tcccaaattc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
 ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatnnnn nnnnnnnnnn nnnngtttcc 120
 40 tggtatcaac agaaaccaga gcagtctcct aaactgctga tatacggggc atccnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnaaccg gtacactggg gtccccnnng atcgcttcac aggcagtgga 240
 nnnnnntctg caacagattt cactctgacc atcagcagtg tgcaggctga agaccttgca 300
 gattatcact gtggacaggg ttacagctat ccgtacacgt tcggaggggg g 351
 45 <210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 <400> 21
 55
 60
 65

ES 2 531 552 T3

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

<210> 22
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 <400> 22

gatgtccaga taacccagtc tccatcttat cttgctgcat ttcctggaga aaccattact 60
 40 attaatgtga gggcaagtaa gagcattagt aaatatnnnn nnnnnnnnnn nnnnttagcc 120
 tggatcaag agagacctgg aaaaactaat aagcttctta tctactctgg atccnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnacttt gcaatctgga attccannnt caaggttcag tggcagtgga 240
 nnnnnntctg gtacagattt cactctcacc atcagtagcc tggagcctga agattttgca 300
 atgtattact gtcaacagca taatgaatac ccgtatacgt tcggaggggg g 351

<210> 23
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 <400> 23

55

60

65

ES 2 531 552 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Xaa Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 10 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Leu Ser Gly Asp Ser Gly Ser Ser Xaa
 50 55 60
 Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 15 Asp Asn Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ala
 85 90 95
 20 Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln Glu Thr Gly Pro Gln Arg
 100 105 110
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
 115 120 125
 25 Ala Pro Thr Leu
 130
 30 <210> 24
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 <400> 24
 40 gaggtgcaac tattggaatc tgggggannn ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 60
 ctctcctgtg cagcctcttg attcagcttt atcgactatg ccnnnnnnnn nnnnatgagc 120
 tgggtccgcc aggctccagg gaagggactg gagtgggtct caagtcttag tggatgatagt 180
 ggtagttcan nnnntatta tgcagactcc gtgaagnnng gccgattcac catctccaga 240
 gacaattcca agagcacggt gtttctgcaa ctgagcagcc tgagagccga ggacacggcc 300
 45 atatattact gtgcgcagga gaccggtccc cagcgctcgt ggggccaggg aaccctggtc 360
 accgtctcct caggagagtgc atccgcccc accctt 396
 50 <210> 25
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 <400> 25
 60
 65

ES 2 531 552 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 10 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Xaa Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 15 Xaa Xaa Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 85 90 95
 20 Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
 100 105 110
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 115 120 125
 25 Pro Ser Val Phe
 130
 <210> 26
 <211> 396
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 35 <400> 26
 gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
 40 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctggnnnn nnnnnnnnnn nnnnttggcc 120
 tggatatcagc agaaaccagg gaaagcccct aaactcctga tctataaggc gtttnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnaattt agaaagtggg gtcccannt caaggttcag aggcagtgcc 240
 nnnnnntctg ggacagaatt cactctcacc atcagcagcc tgcagcctga tgattctgca 300
 acttattact gccagcagta tagtagttac cccctcactt tcggcggagg gaccaaggtg 360
 45 gacattaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttc 396
 <210> 27
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 55 <400> 27

ES 2 531 552 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Glu
 1 5 10 15
 5 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 35 40 45
 10 Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Xaa
 50 55 60
 Xaa Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Xaa Gly Arg Val Thr Met Thr Arg
 65 70 75 80
 15 Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser
 85 90 95
 20 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Tyr Pro Gly
 100 105 110
 Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125
 25
 <210> 28
 <211> 378
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 35 <400> 28
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nccagggnn nagnananga aancggaggc ctcaagtgaag 60
 gtctcctgca aggccttctgg atacaccttc accggctact atnnnnnnnn nnnnatgcac 120
 40 tgggtgcgac aggcccttgg acaagggtt gagtggatgg gatggatcaa ccctaacagt 180
 ggtggcacan nnnnnaacta tgcacagaag tttcagnnng gcagggtcac catgaccagg 240
 gacacgtcca tcagcacagc ctacatggag ctgagcaggc tgagatctga cgacacggcc 300
 gtgtattact gtgcgagaga tcgatcgtat ccgggaagga actactttga ctactggggc 360
 cagggaaccc tggtcacc 378
 45 <210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 <400> 29
 55
 60
 65

ES 2 531 552 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 10 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 15 Xaa Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 85 90 95
 20 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser His Thr
 100 105 110
 25 Phe Gly Gln Gly
 115
 <210> 30
 <211> 348
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 35 <400> 30
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 40 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctacn nnnnnnnnnn nnnnttagcc 120
 tggtagcagc agaaacctgg ccaggctccc aggtcctca tctatggtgc atccnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnagcag ggccactggc atccannng acaggttcag tggcagtggg 240
 nnnnnntctg ggacagactt cactctcacc atcagcagac tggagcctga agattttgca 300
 45 gtgtattact gtcagcagta tggtagctct cacacttttg gccagggg 348
 <210> 31
 <211> 126
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 55 <400> 31
 60
 65

ES 2 531 552 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 10 Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Xaa
 50 55 60
 15 Xaa Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 85 90 95
 20 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 25 Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 <210> 32
 <211> 378
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 35 <400> 32
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnngannn ggcttgggtca agcctggagg gtccctgaga 60
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agtgactact acnnnnnnnnn nnnnatgagc 120
 40 tggatccgcc aggctccagg gaaggggctg gagggtgtt catatattag tagtagtagt 180
 agttacacan nnnnnaacta cgcagactct gtgaagnnng gccgattcac catctccaga 240
 gacaacgcca agaactcact gtatctgcaa atgaacagcc tgagagccga ggacacggct 300
 gtgtattact gtgagagaga tcgggtcgagc agcagctggt actactacta ctacgggtatg 360
 45 gacgtctggg gcccaaggg 378
 <210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 55 <400> 33
 60
 65

ES 2 531 552 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 10 Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Xaa Ser Arg Phe Asn Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 15 Xaa Xaa Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 85 90 95
 20 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Lys Cys Pro Ser
 100 105 110
 His Phe Arg Gly Arg Asp
 115
 25 <210> 34
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 <400> 34
 35 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatnnnn nnnnnnnnnn nnnnttagcc 120
 tggtatcagc agaaaccagg gaaagttcct aagctcctga tctatgctgc atccnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnacttt gcaatcaggg gtccannnt ctcggttcaa tggcagtgga 240
 40 nnnnnntctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc tgcaacctga agatgttgca 300
 acttattact gtcaaaagta taacaagtgc ccctctcact ttcgggggag ggac 354
 <210> 35
 <211> 115
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.
 50 <400> 35
 Asp Ile Ala Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 55
 60
 65

ES 2 531 552 T3

	1				5						10					15
	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Leu	Phe	Ser
				20					25					30		
5	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
			35					40					45			
10	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			50				55						60			
	Xaa	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Xaa	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
	65					70					75					80
15	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala
					85					90					95	
20	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ile
				100					105					110		
	Thr	Phe	Gly													
			115													
25	<210> 36															
	<211> 345															
	<212> ADN															
	<213> Homo sapiens															
30	<220>															
	<223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.															
	<400> 36															
35	gacatcg	cgga	tgaccc	agtc	tccagact	ccc	ctggcagt	gt	ctctggg	cgga	gagggcc	cacc	60			
	atcaact	gca	agtc	cagccg	gagtgt	tttta	ttcagct	cca	acaata	aaca	ctactt	tagct	120			
	tggtacc	agc	agaa	accagg	acagcct	cct	aagctact	ca	tttact	gggc	atctn	nnnnn	180			
	nnnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	240			
40	nnnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	nnnnn	300			
	gattt	attact	gtcag	caata	ttatag	tact	ccaat	cacct	tcggc				345			
	<210> 37															
	<211> 117															
45	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
	<220>															
50	<223> Todas las "Xaa" en la secuencia representan aminoácidos desconocidos.															
	<400> 37															
55																
60																
65																

ES 2 531 552 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 10 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 15 Xaa Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Xaa Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 20 Xaa Xaa Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 85 90 95
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu
 100 105 110
 25 Thr Phe Gly Ala Gly
 115
 <210> 38
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> Todas las "n" en la secuencia representan ácidos nucleicos desconocidos.
 <400> 38
 40 gacatcgtaa tgacgcagtc tcacaaattc atgtccactt cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc ggaatgtgagt actgctnnnn nnnnnnnnnn nnnngtagcc 120
 tggatcaaac agaaaccagg acaatctcct aaactactga ttactcggc atccnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnntaccg gtacactgga gtccctnnng atcgcttcac tggcagtgga 240
 nnnnnntctg ggacggattt cactttcacc atcagcagtg tgcaggctga agacctggca 300
 gtttattact gtcagcaaca ttatactact ccgctcacgt tcggtgctgg g 351
 45
 <210> 39
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador.
 50
 <400> 39
 55 actcccaagt cggctcgctt tctcttcagt gacaaacaca gacatagaac attcaccatg 60
 ggatggagct gtatcact 78
 60
 <210> 40
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador.
 5 <400> 40
 actgactctc ttaattaaga ctcacctgag gagactgtga gagtggt 47
 <210> 41
 <211> 48
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador.
 15 <400> 41
 ttggcgcgcc aaagactcag cctggacatg atgtcctctg ctcagttc 48
 <210> 42
 <211> 43
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador.
 25 <400> 42
 atagtttagc ggccgcattc ttatctaaca ctctcccctg ttg 43
 <210> 43
 <211> 155
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador.
 <400> 43
 40 gactcgggtcc gccagccac tggaagtgcg cgggtgtttcc attcgggtgat catcactgaa 60
 cacagaggac tcaccatgga gtttgggctg agctgggttt tcctcggttg tcttttaaga 120
 ggtgtccagt gtcaggtgca gctggtggag tctgg 155
 <210> 44
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador.
 50 <400> 44
 cctaattaa gacctggaga ggccattctt acctgaggag acggtgacca ggggtc 56
 <210> 45
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador.
 60 <400> 45
 ctagctagcg tcctaggtca gcccaaggct gcccc 36
 65

ES 2 531 552 T3

5
 <210> 46
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador.

15
 <400> 46
 atagtttagc ggccgcacct atgaacattc tgtagg 36

20
 <210> 47
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador.

30
 <400> 47
 ctagctagcc cgaatttcgg gacaatcttc atcatgacct gctccctct cctcctcacc 60
 cttctcattc actgcacagg gtctggggcc cagtctgtgt tgacgcagcc g 111

35
 <210> 48
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

45
 <400> 48
 gggcagcctt gggctgagct aggacggtca gc 32

50
 <210> 49
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55
 <400> 49

60

65

ES 2 531 552 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Val Thr Gly Ser Pro Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 50
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ile Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal humano, monómero o fragmento activo del mismo, **caracterizado por** su capacidad para unirse a oligodendrocitos, o un anticuerpo sintético derivado del mismo y que tiene la capacidad de unirse a oligodendrocitos, con las siguientes características:
 - (a) capaz de inducir la remielinización;
 - (b) capaz de promover la proliferación celular de células gliales; y
 - (c) capaz de promover la señalización de Ca^{2+} en oligodendrocitos; y que:
 - 10 comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 17, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 18;
 - 15 comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 19, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 20; o
 - 20 comprende una región variable de la cadena pesada que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 27, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene las secuencias de la región CDR1, CDR2 y CDR3 como se expone en la Figura 28.
2. El anticuerpo monoclonal de la Reivindicación 1, que es del subtipo IgM.
3. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en:
 - 25 (a) estimular la remielinización de los axones del sistema nervioso central en un mamífero que necesite dicha terapia; o
 - (b) tratar una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central en un mamífero que necesite dicha terapia.
- 30 **4.** Un procedimiento in vitro de estimular la proliferación de células gliales de cultivos mixtos, que comprende:
 - (a) cultivar un cultivo celular mixto que contiene células gliales en condiciones suficientes para la proliferación celular;
 - 35 (b) introducir en el cultivo mixto una cantidad eficaz de un autoanticuerpo como se define en las reivindicaciones 1 ó 2, de modo que se produce un cultivo mixto tratado con anticuerpo;
 - (c) mantener el cultivo de la etapa (b) en condiciones suficientes para proliferación de células tratadas con el anticuerpo, de modo que tiene como resultado la proliferación de las células gliales en el cultivo mixto; y
 - (d) recoger las células gliales del cultivo mixto.
- 40 **5.** Una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, un autoanticuerpo monoclonal humano, un fragmento activo del mismo, o un monómero, o un autoanticuerpo sintético derivado del mismo y que tiene la capacidad de unirse a oligodendrocitos como se ha definido en las reivindicaciones 1 ó 2.
- 45 **6.** El anticuerpo monoclonal de las Reivindicaciones 1 ó 2, marcado con un marcador aceptable.
- 7.** Una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica al menos un dominio variable de un autoanticuerpo monoclonal humano, un fragmento activo del mismo, o un monómero, o un autoanticuerpo sintético derivado del mismo, cada uno tiene la capacidad de unirse a oligodendrocitos y las características y CDRs definidas en las reivindicaciones 1 ó 2.
- 50 **8.** El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico es una secuencia de ADN o una secuencia de ARN.
- 9.** El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor de la transcripción del ARN.
- 55 **10.** El ácido nucleico aislado de la reivindicación 8, en el que dicha secuencia de ADN está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 60 **11.** Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 9 ó 10.
- 12.** El vector de la Reivindicación 11, en el que el vector es un plásmido, un cósmido, cromosoma artificial de levadura (YAC), bacteriófago o ADN viral eucariótico.
- 65 **13.** Un sistema vector del huésped para la producción de un polipéptido que comprende el vector de la

reivindicación 11 en una célula huésped adecuada.

14. Un virus recombinante transformado con el ácido nucleico asilado de cualquiera de las Reivindicaciones 7, 8, 9 ó 10.

15. Un procedimiento de obtención de un polipéptido que comprende:

- (a) cultivar un sistema de vector del huésped de la reivindicaciones 13, para producir el polipéptido; y
- (b) recuperar el polipéptido producido en la etapa (a); y
- (c) purificar el polipéptido recuperado en la etapa (b).

16. Un kit de ensayo para demostrar la presencia de un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones 1 ó 2 en una muestra celular eucariota, que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de dicho anticuerpo;
 - (b) una cantidad predeterminada de una pareja de unión específica de dicho anticuerpo; y
 - (c) direcciones para el uso de dicho kit;
- (i) en el que dicho anticuerpo o dicha pareja de unión específica se marcan de forma detectable.

FIG. 1A

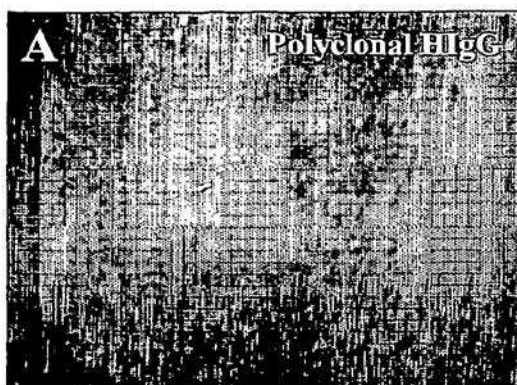


FIG. 1B

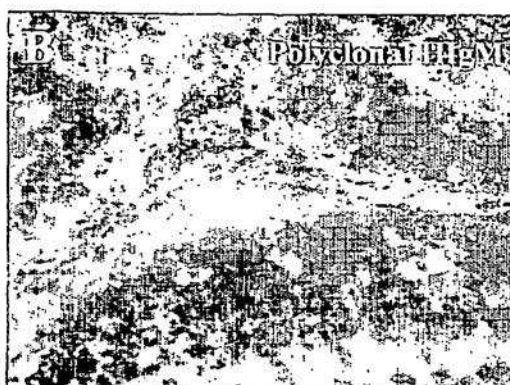


FIG. 1C

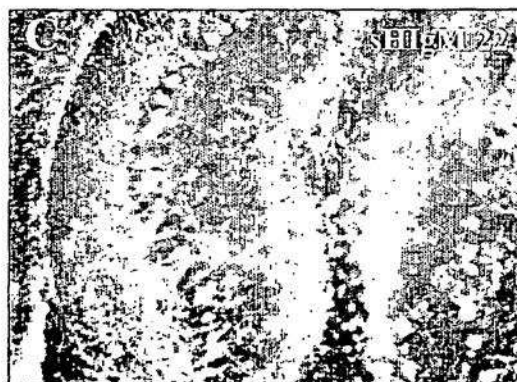


FIG. 1D

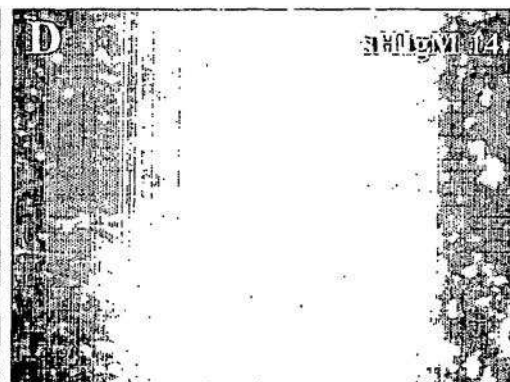


FIG. 1E

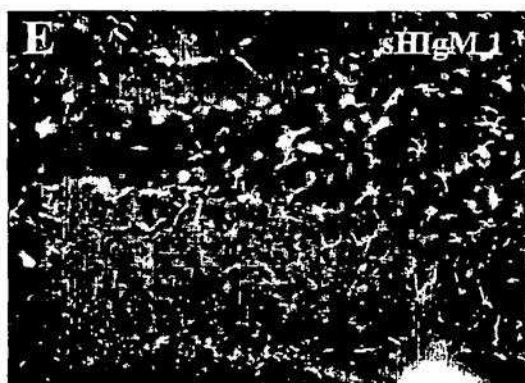


FIG. 1F



FIG. 2A

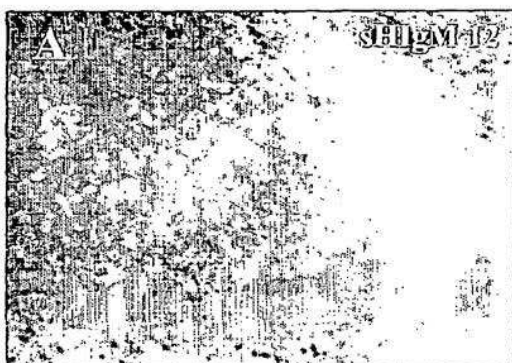


FIG. 2B

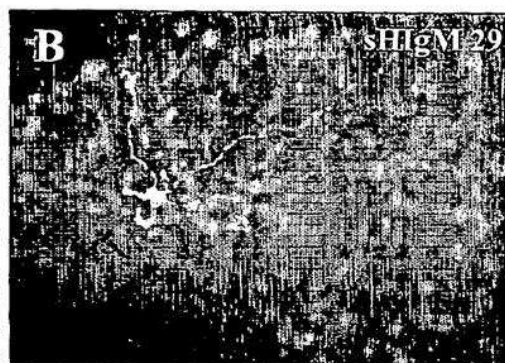


FIG. 2C



FIG. 2D



FIG. 2E



FIG. 2F



FIG. 3A

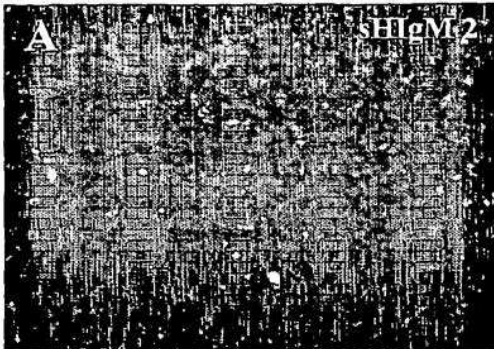


FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D

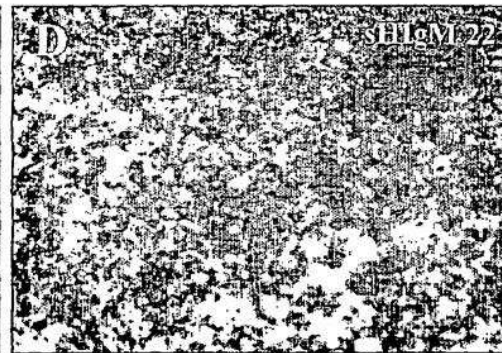


FIG. 3E



FIG. 4A



FIG. 4B

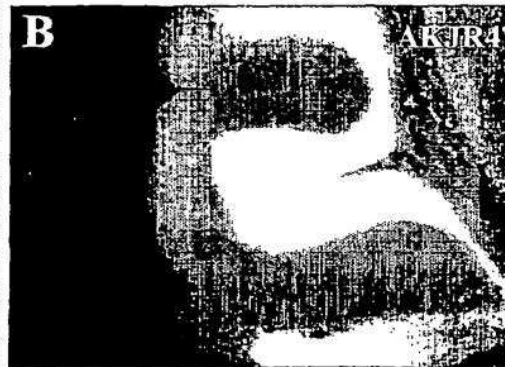


FIG. 4C



FIG. 4D

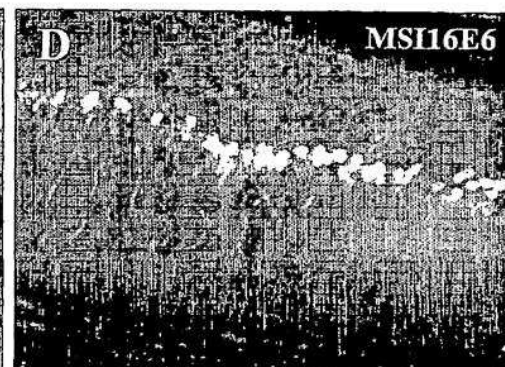


FIG. 4E

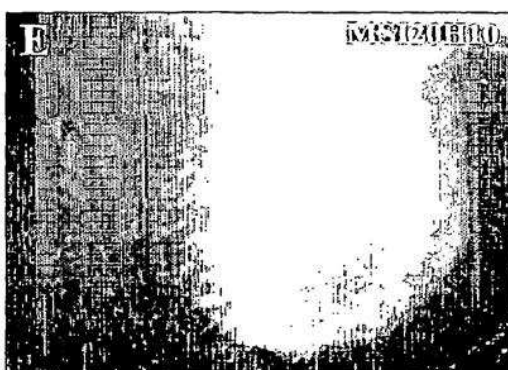


FIG. 4F

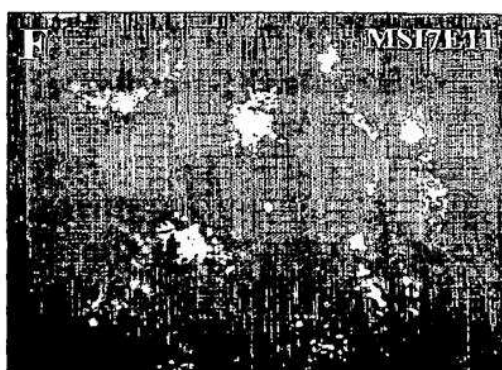


FIG. 5A

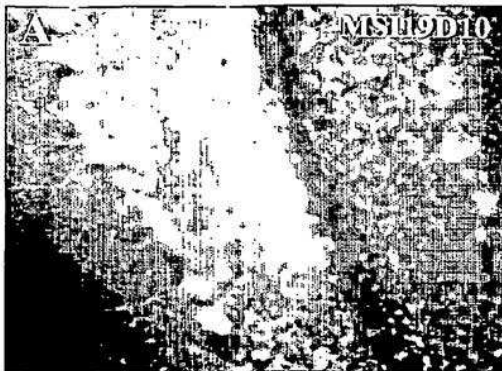


FIG. 5B

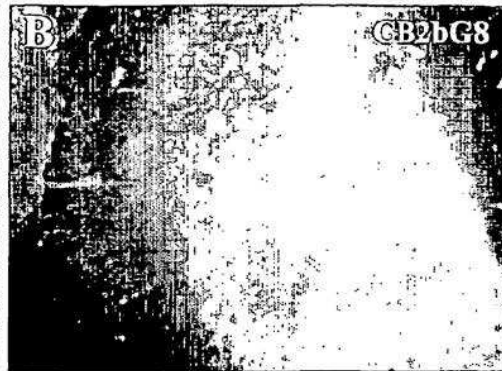


FIG. 5C



FIG. 5D

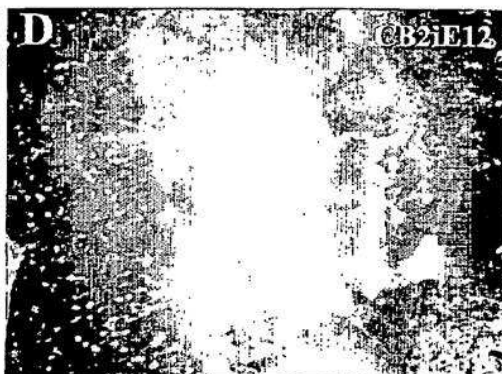


FIG. 5E



FIG. 5F



FIG.6A



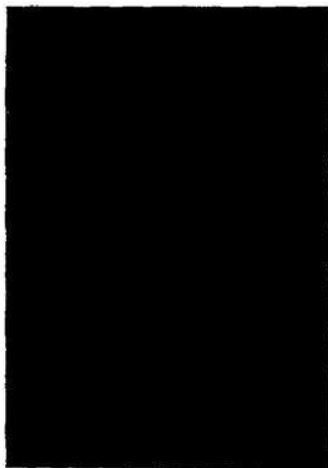
hlgM policlonal

FIG. 6B



MBP+OL

FIG. 6C



hlgG policlonal

FIG. 6D



sHIgM 1

FIG. 6E



sHIgM 2

FIG. 7A



FIG. 7B

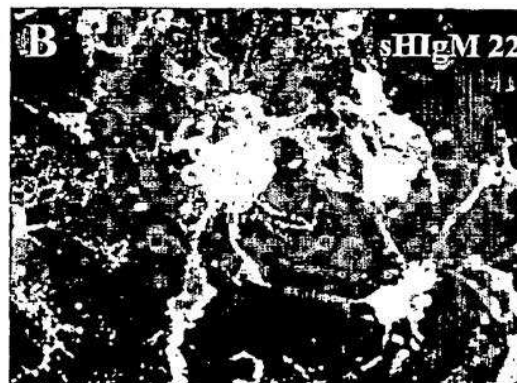


FIG. 7C

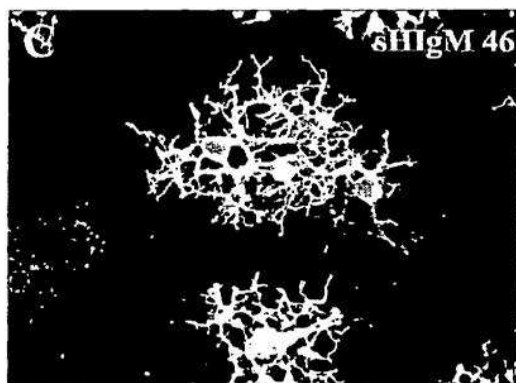


FIG. 7D

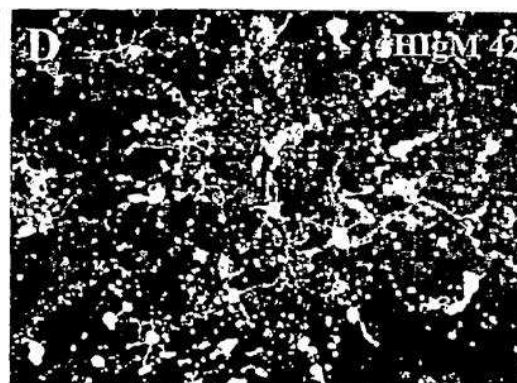


FIG. 7E

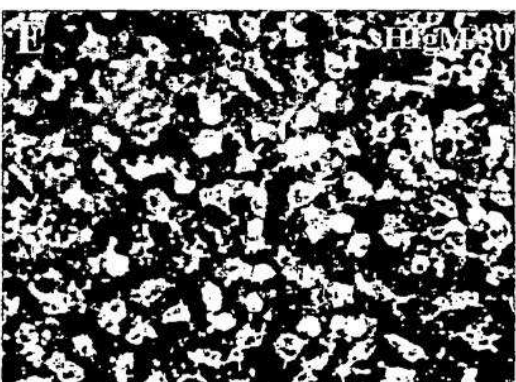


FIG. 7F

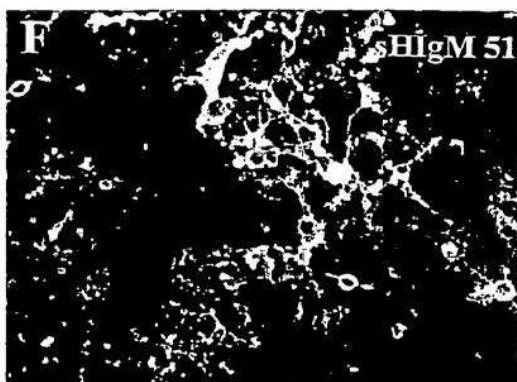


FIG. 8A

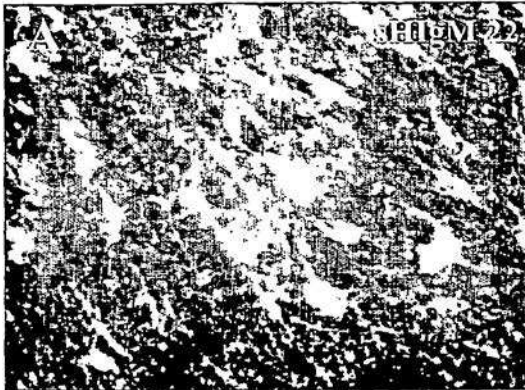


FIG. 8B

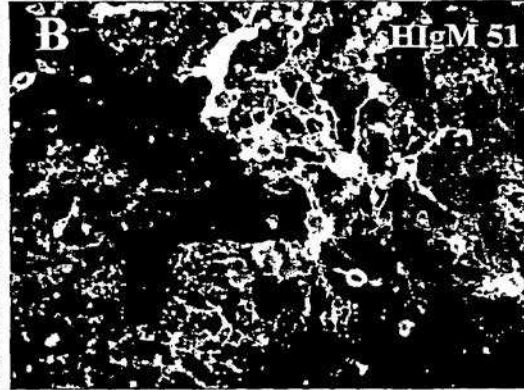


FIG. 8C

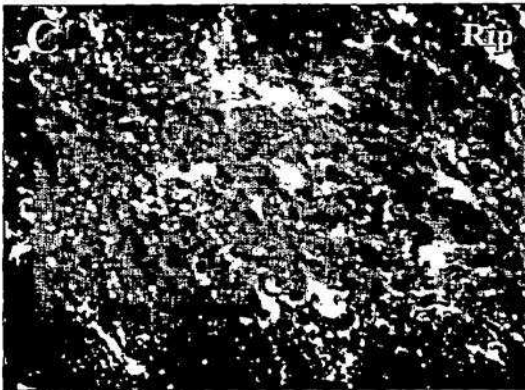


FIG. 8D

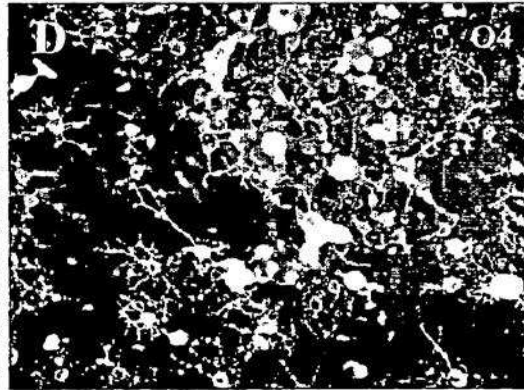


FIG. 8E

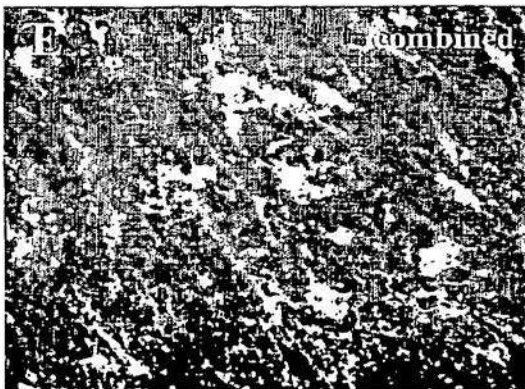


FIG. 8F

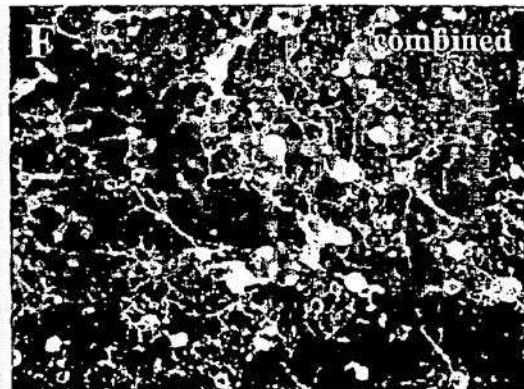


FIG. 9A

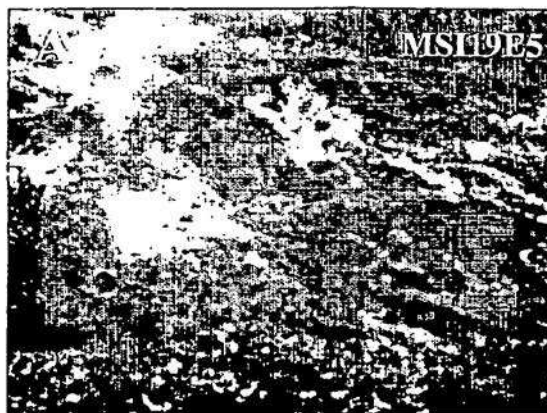


FIG. 9B

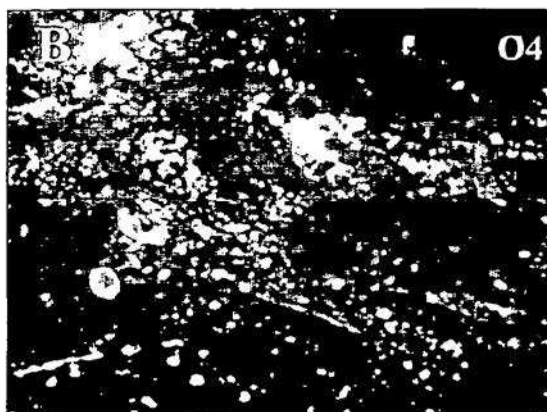


FIG. 9C

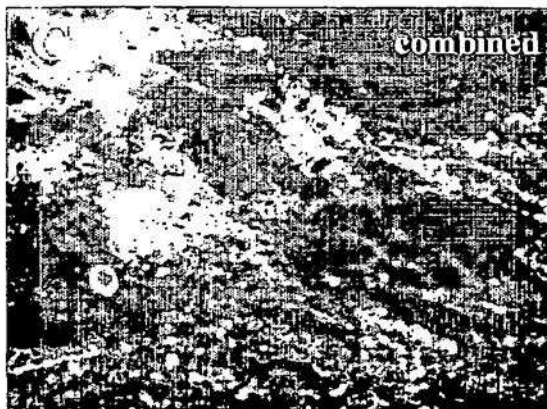


FIG. 10
sHlgMs caracterizado por unión a SCH mediante ELISA

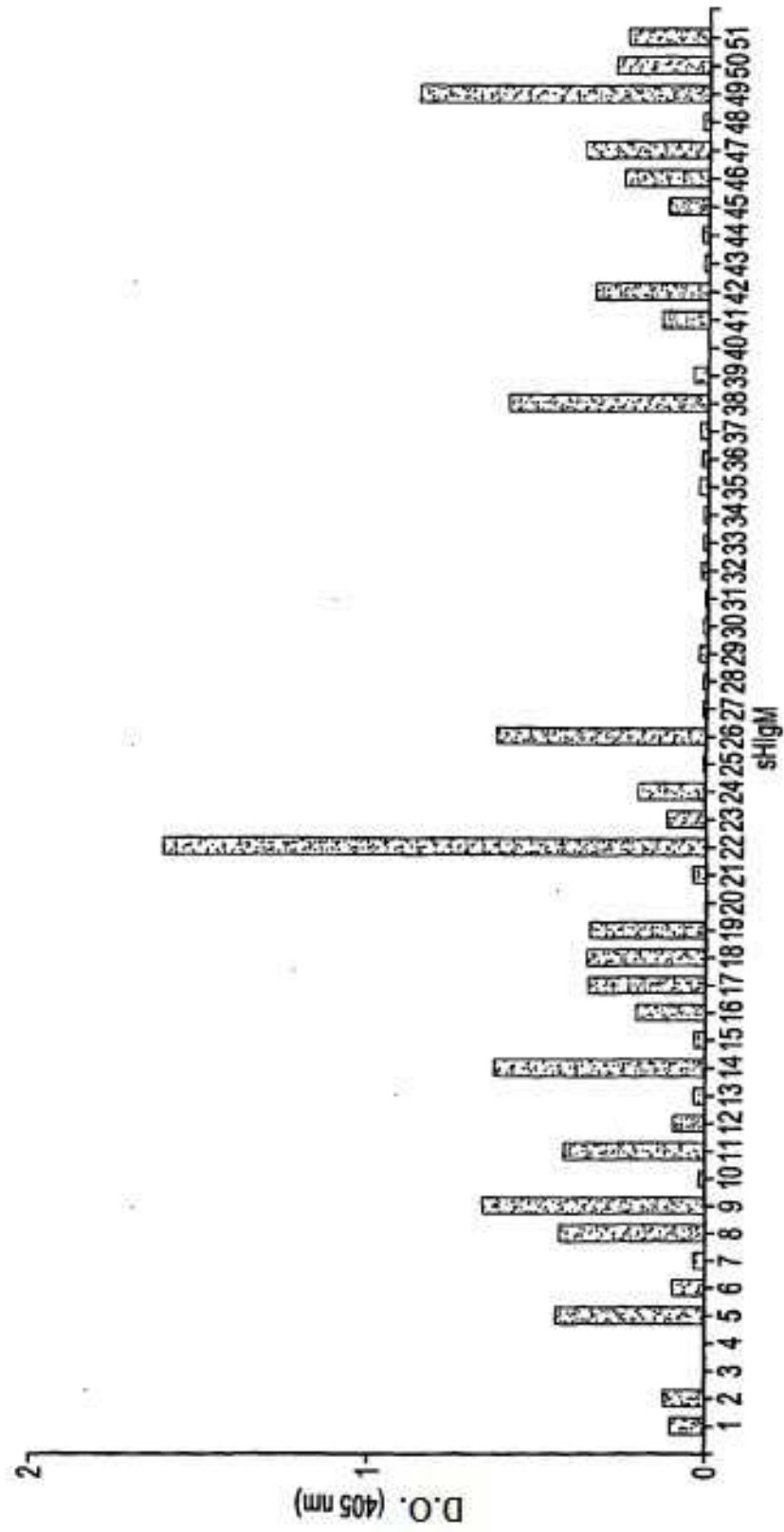


FIG. 11A

ebvHlgMs caracterizado por la unión a SCH mediante ELISA

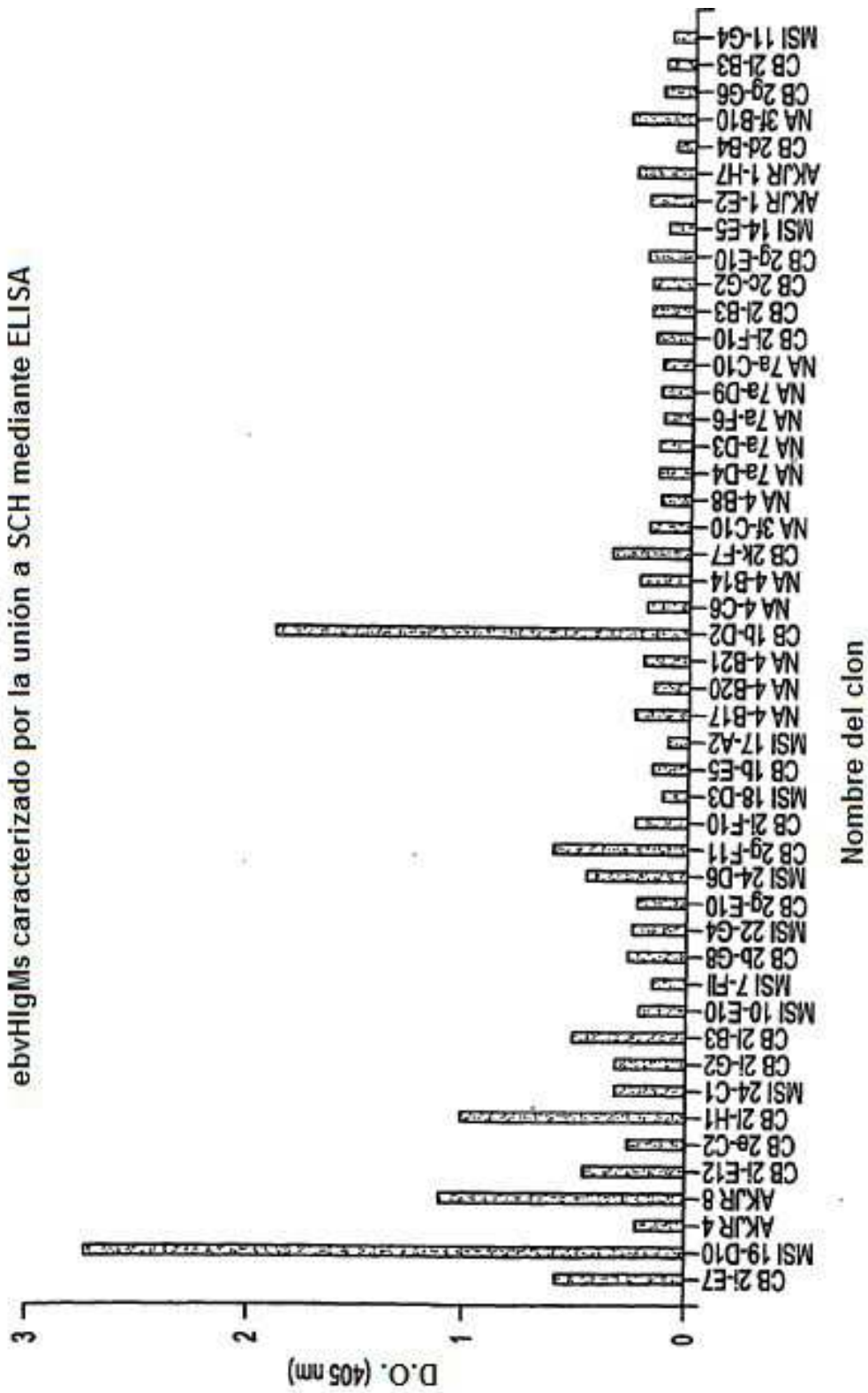


FIG. 11B
ebvHlgMs caracterizado por la unión a SCH mediante ELISA

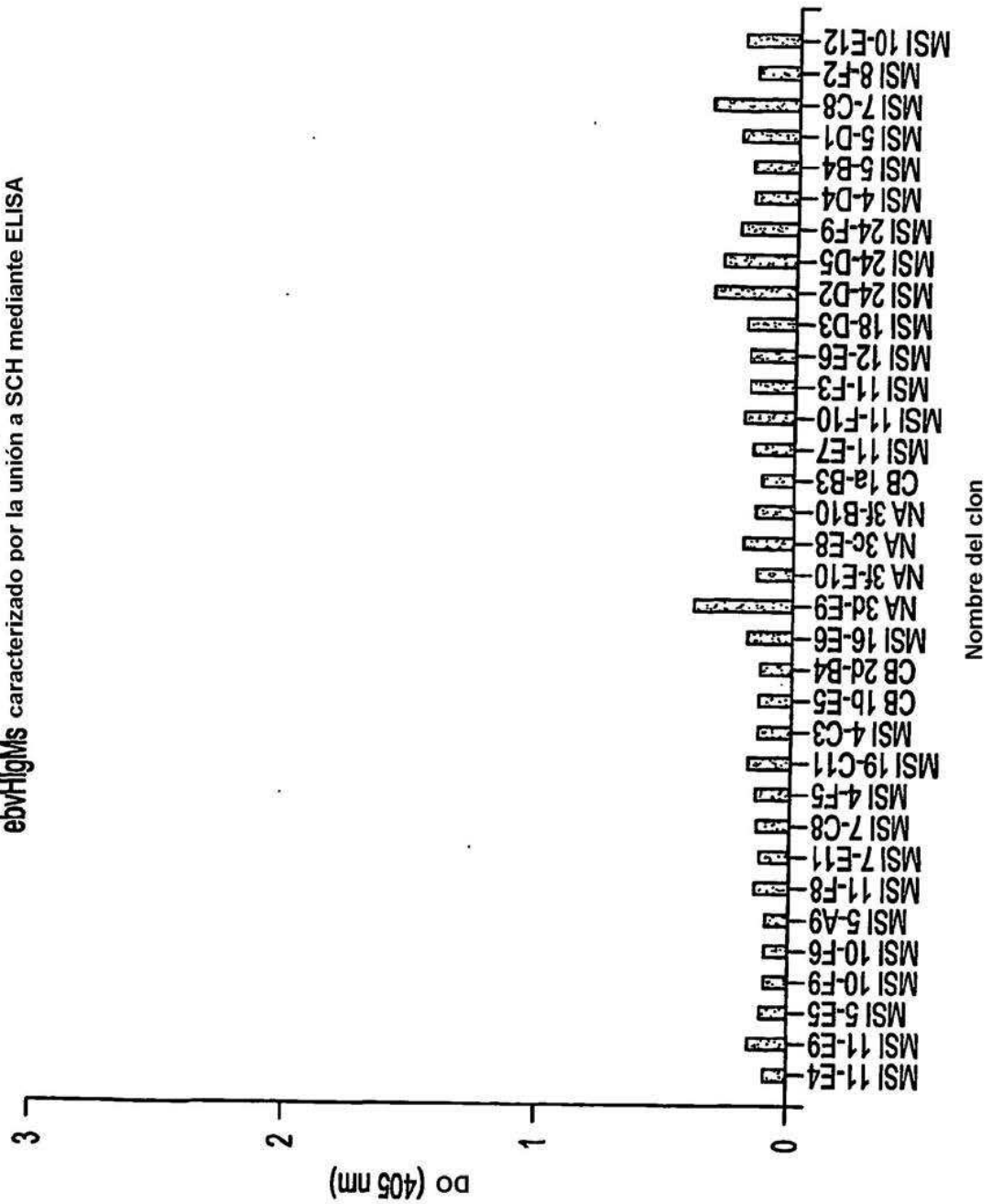


FIG. 12A

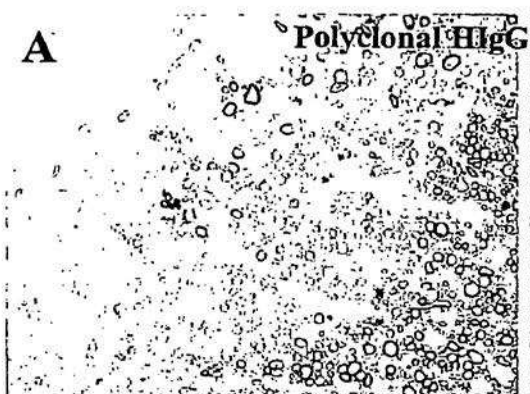


FIG. 12B

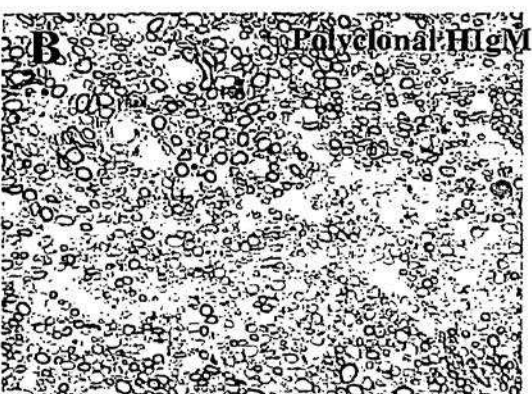


FIG. 12C



FIG. 12D



FIG. 12E

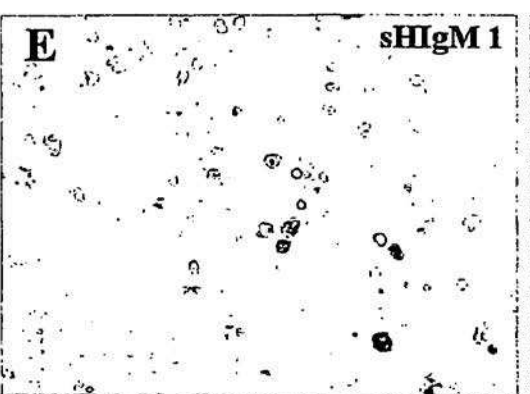


FIG. 12F

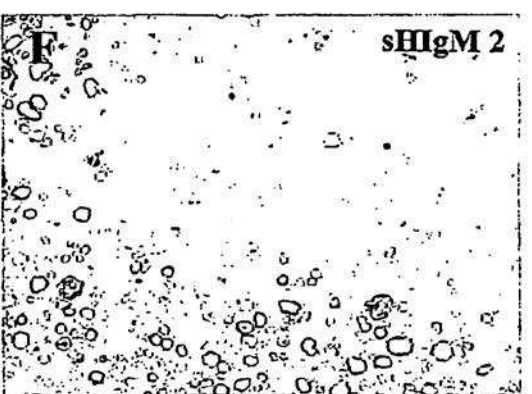


FIG. 13A

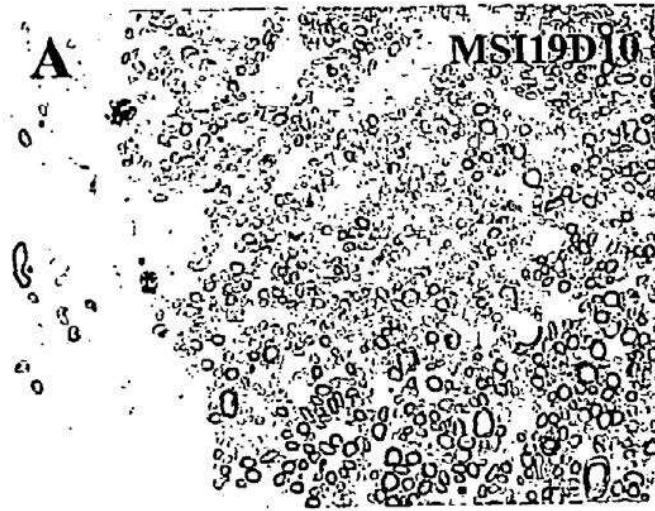


FIG. 13B

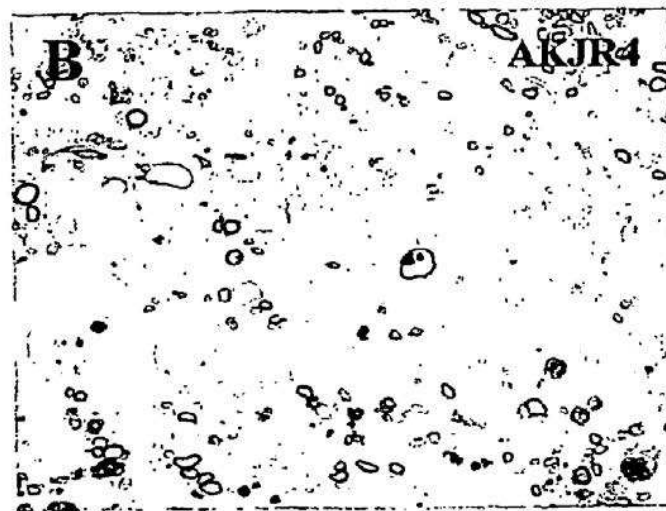


FIG. 14

Experimento con lisolecitina, experimento de 21 días

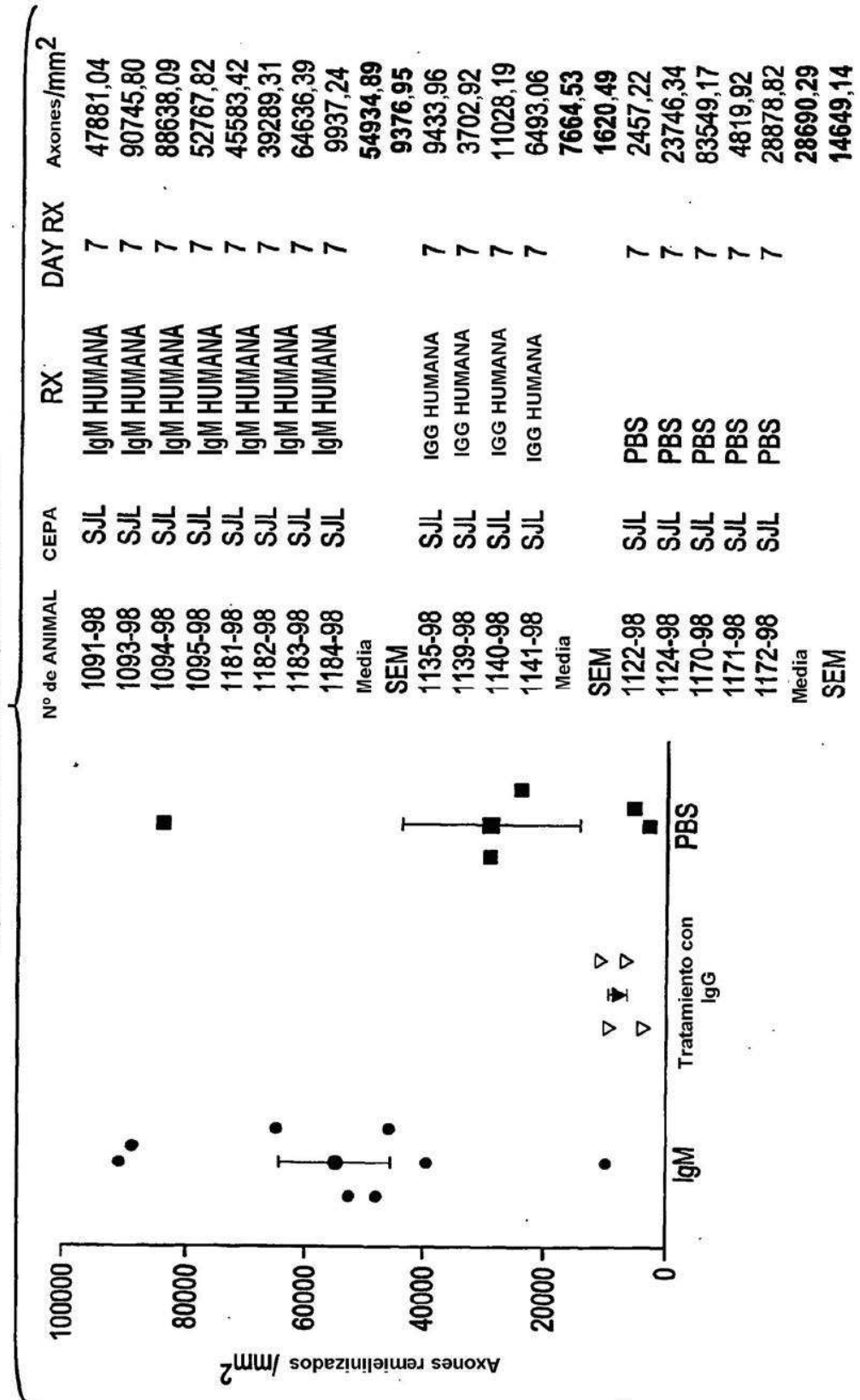


FIG. 15A

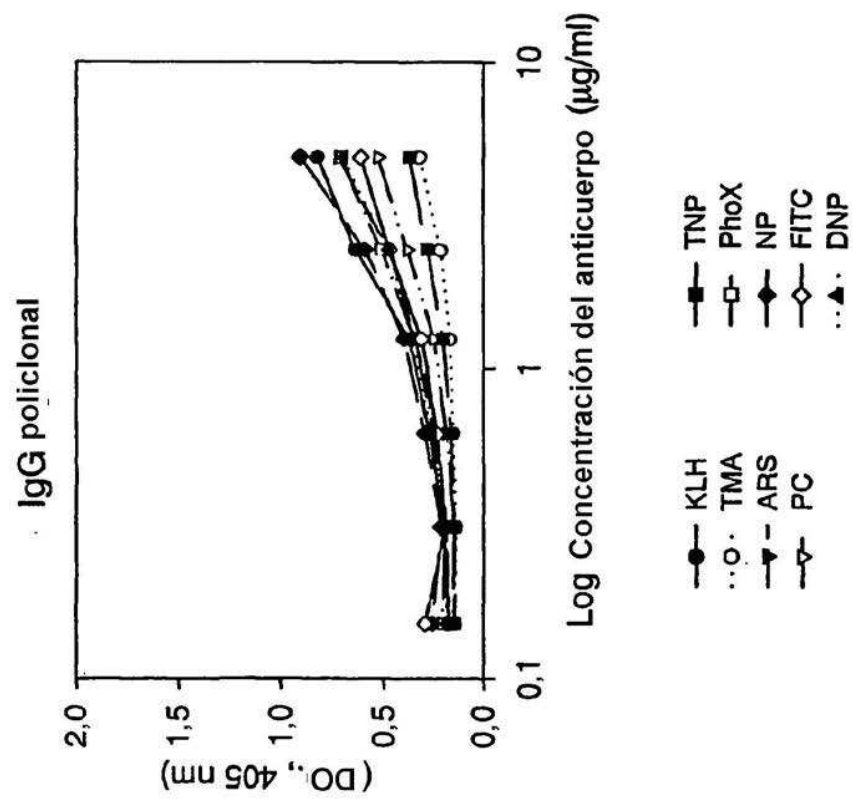


FIG. 15B

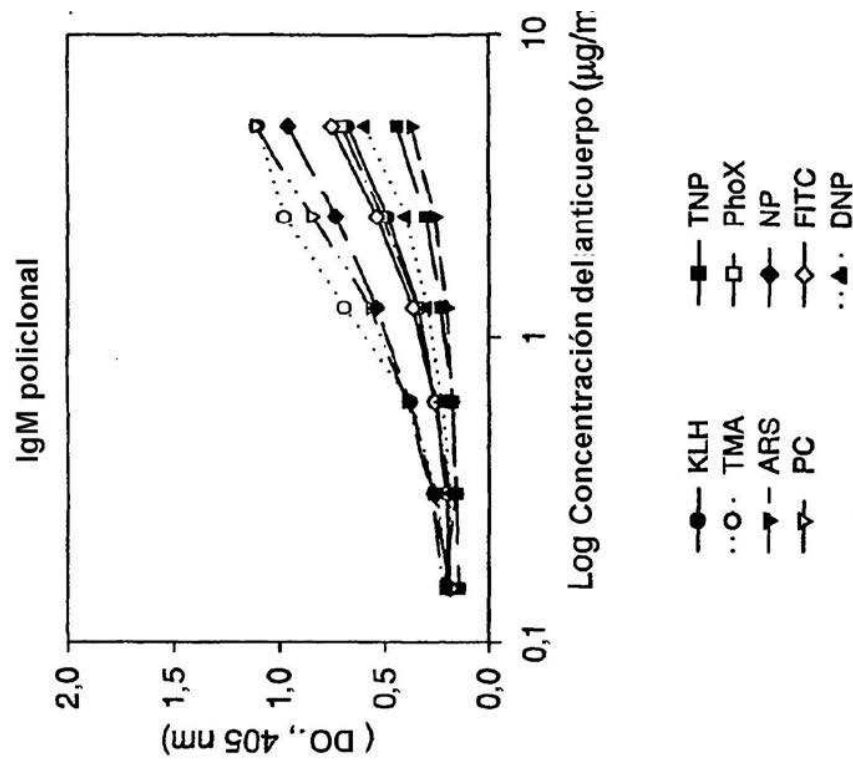


FIG. 15C

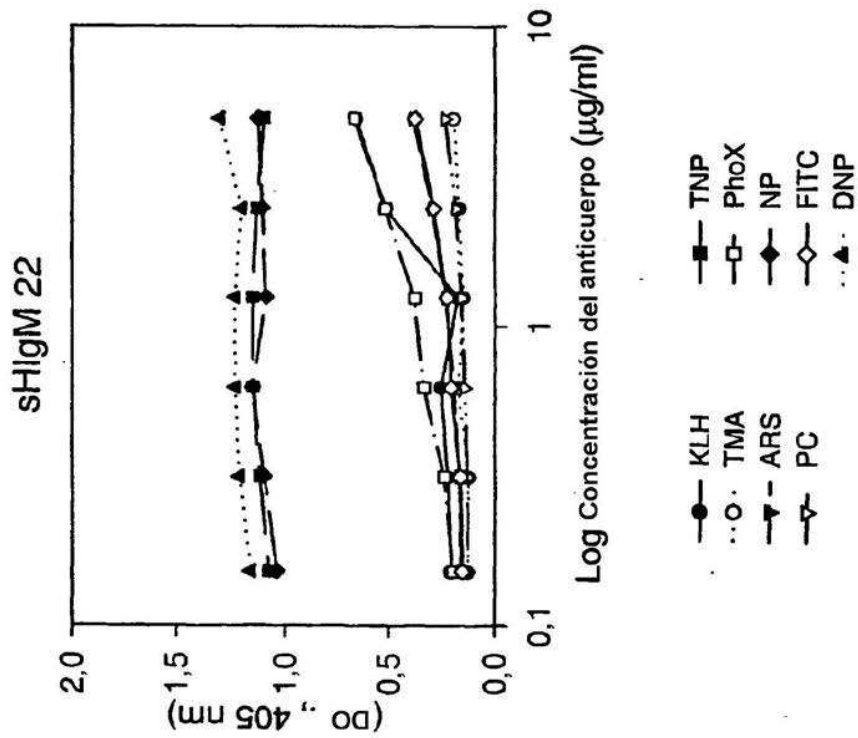


FIG. 15D

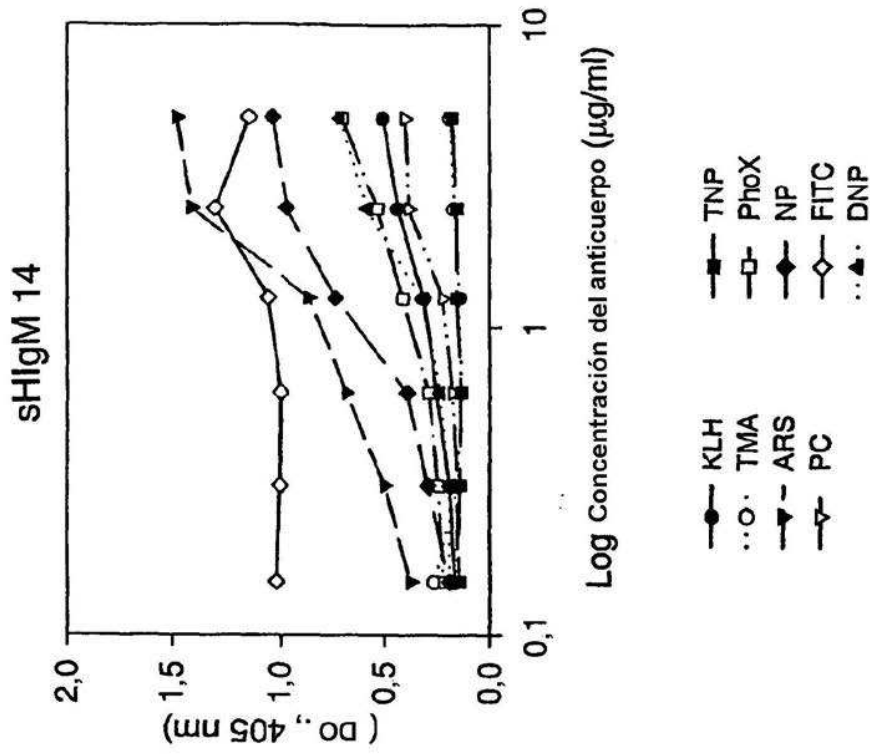


FIG. 15E

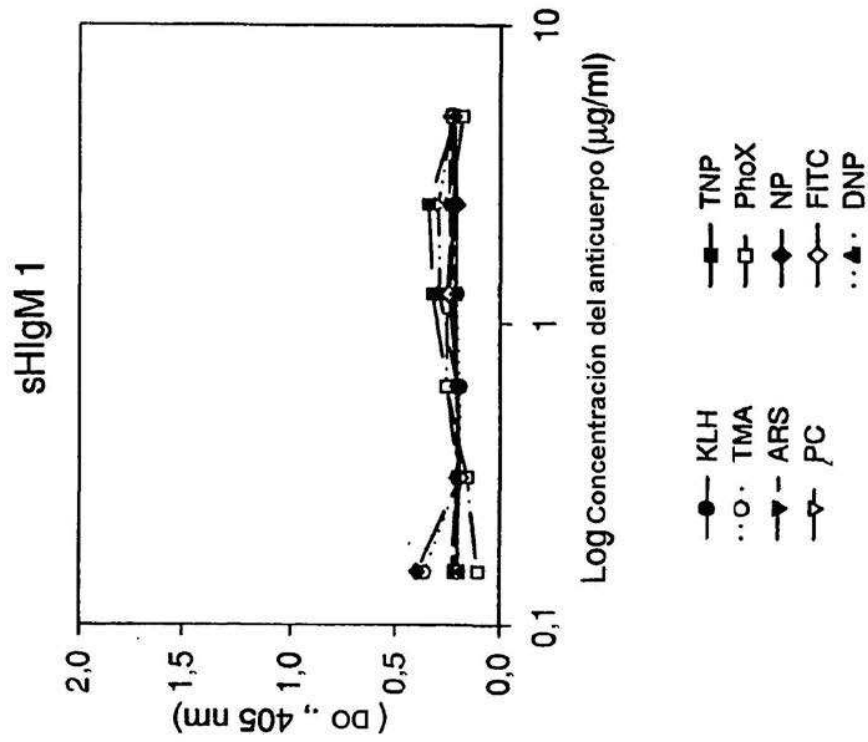


FIG. 15F

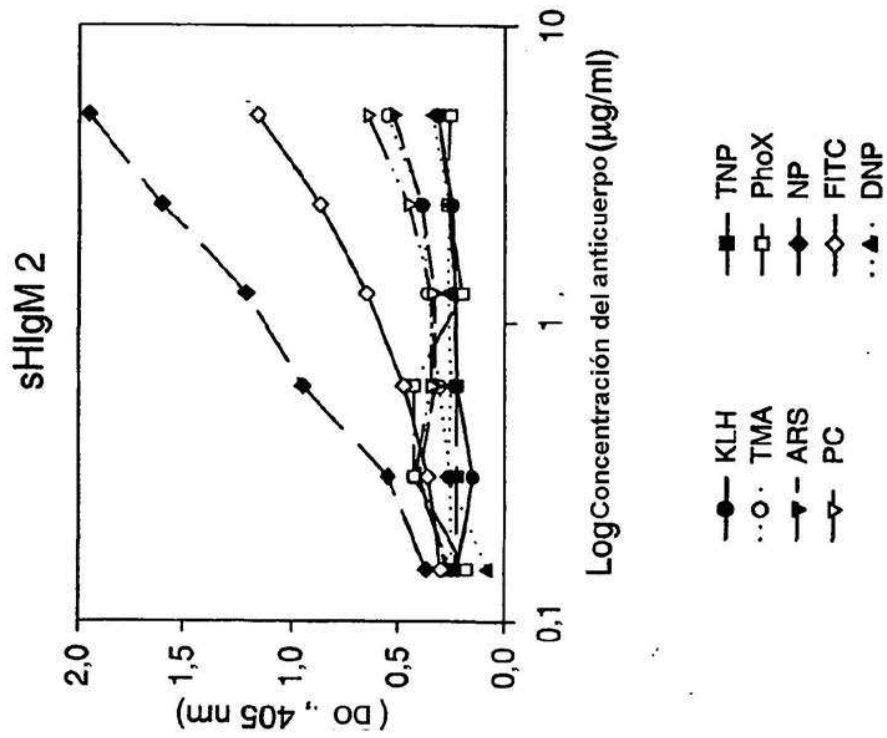


FIG. 16A

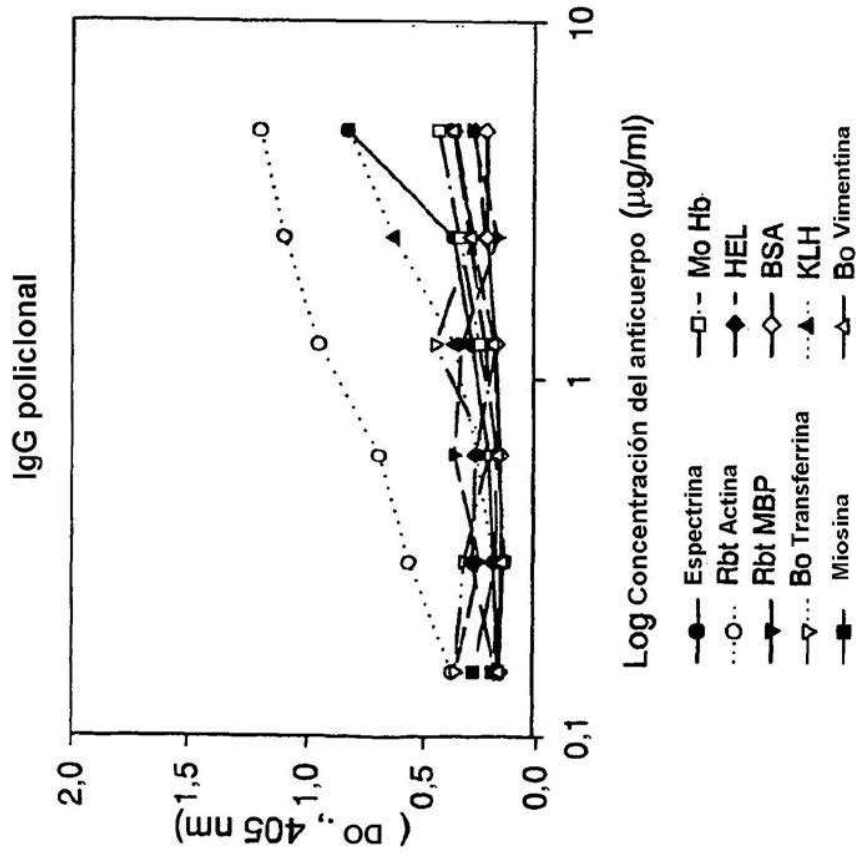


FIG. 16B

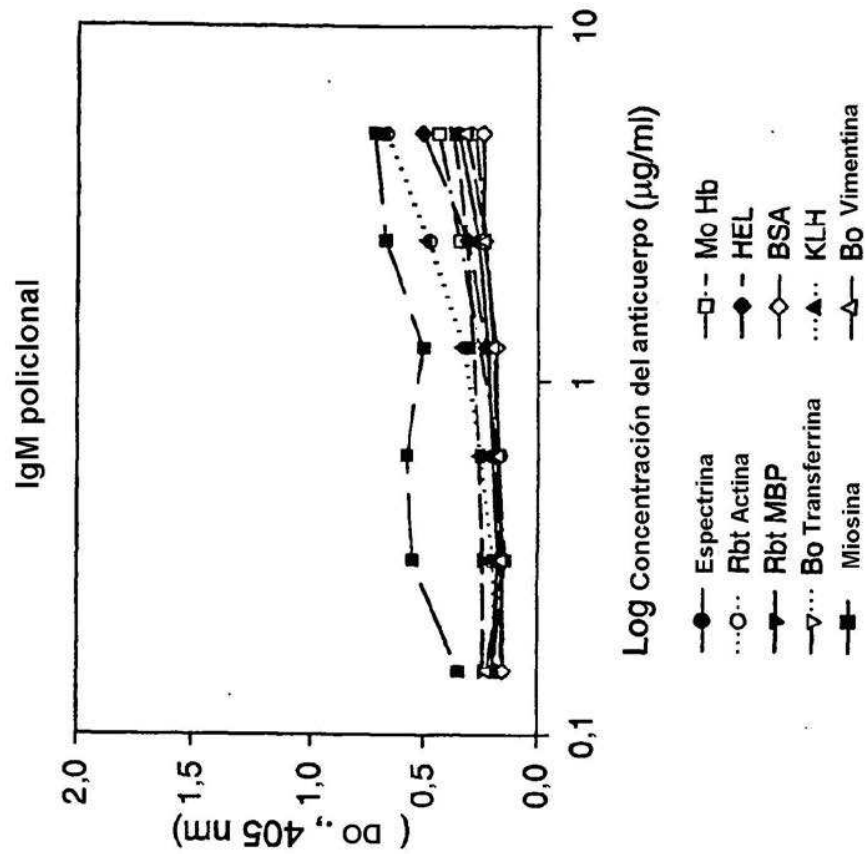


FIG. 16C

sHIgM 22

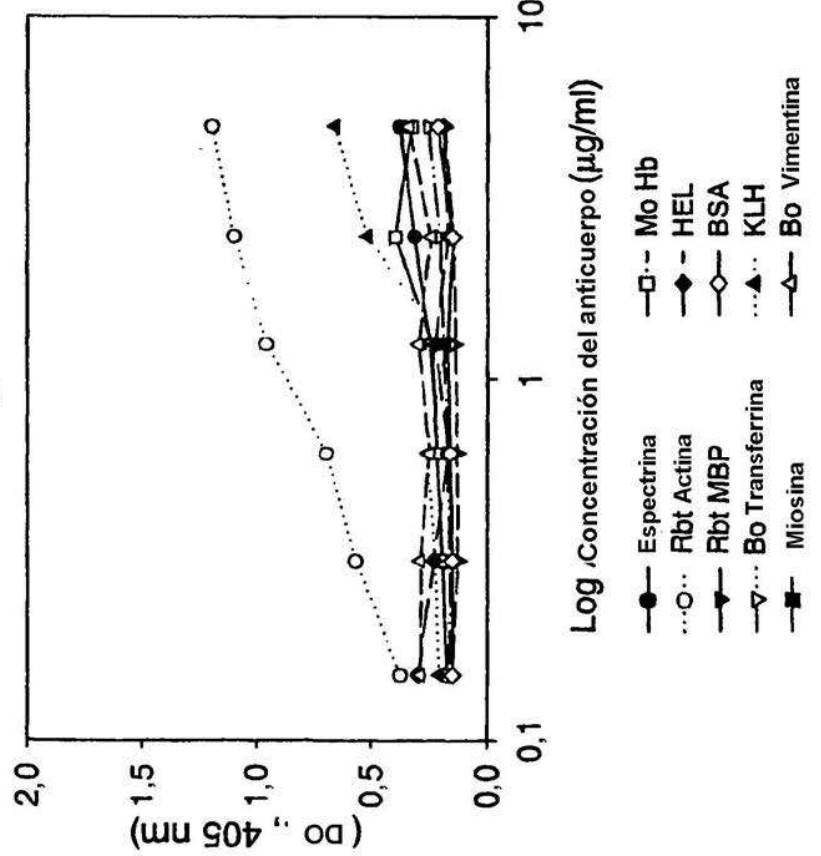


FIG. 16D

sHIgM 14

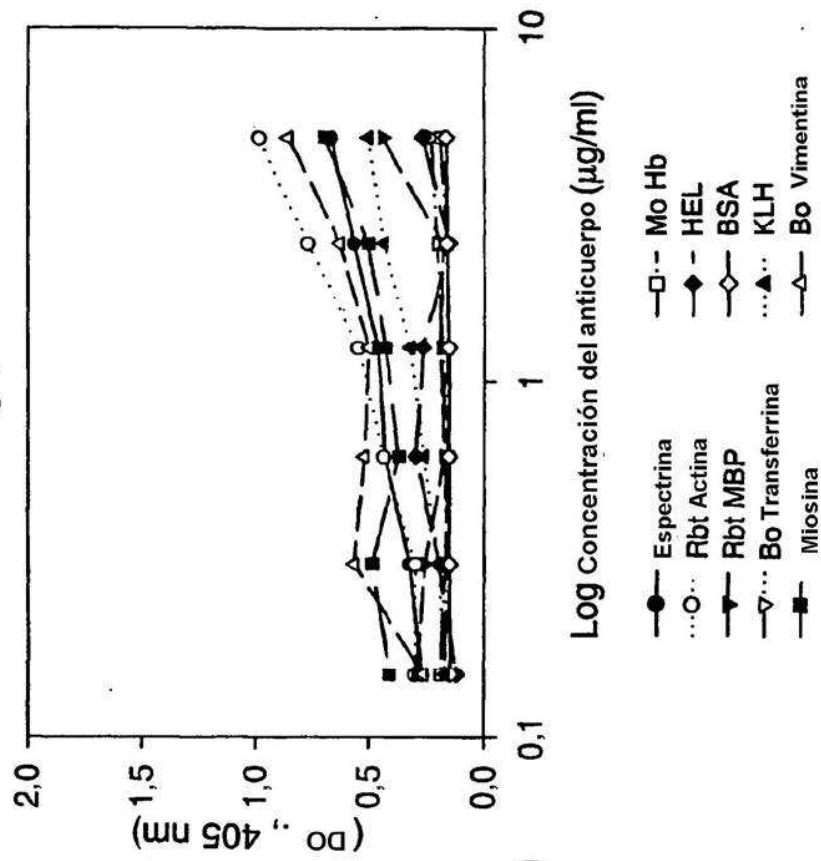


FIG. 16E

sHIgM 1

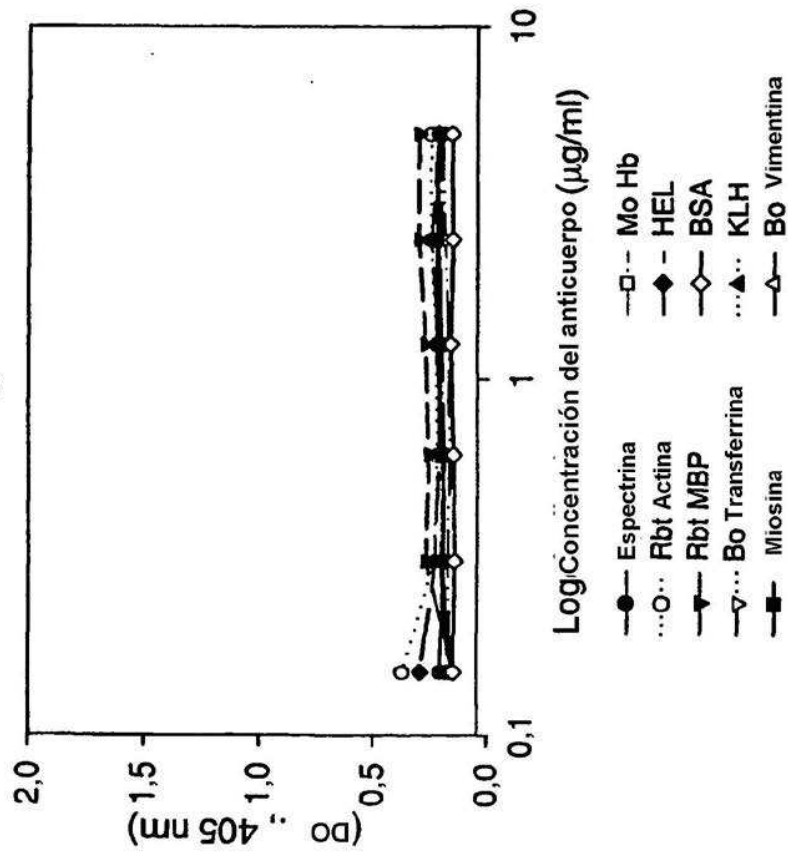


FIG. 16F

sHIgM 2

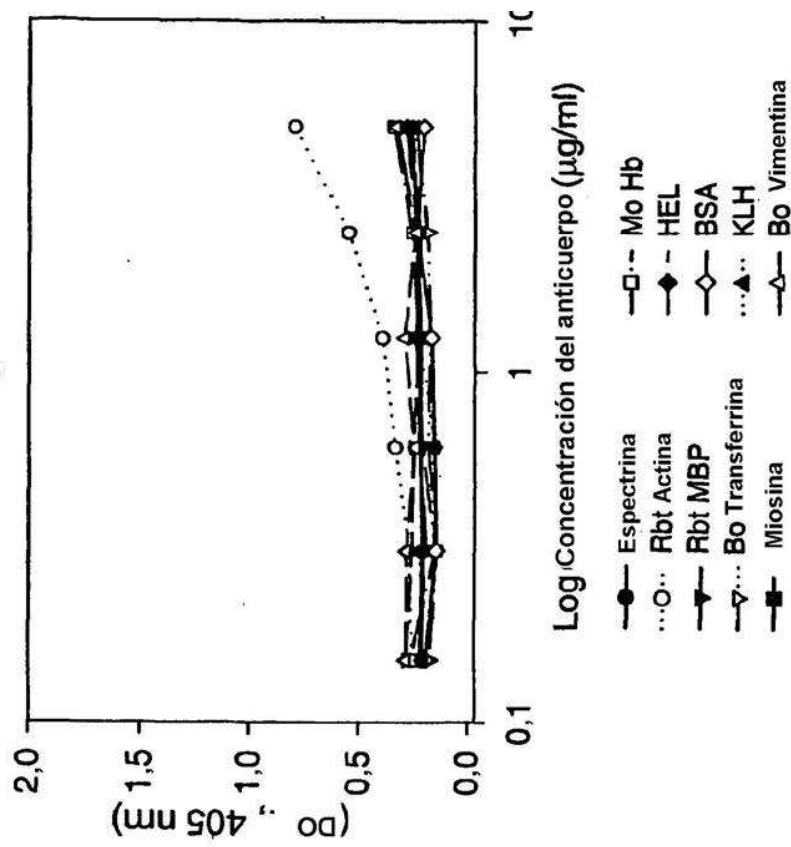


FIG. 17

/FR1-----														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
O	V	O	L	V	E	S	G	G	G	V	V	O	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														

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														

/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
A C T														

/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														

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 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														

/FR4-----														
100B	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
L	D	Y	W	G	O	G	T	L	V	T	V	S	S	
TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	
C														
C														

FIG. 18

/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							
Clon II sH-IgM.22 Vλ					G			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	O	L	P	G	T	A	P	
AAT	AAT	TAT	GTA	TCC	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	
		T													
		T						A							
								A							
-----/CDR2-----															
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								
-----/FR3-----															
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								
						AGT	GC								
-----/Cλ-----															
103	104	105	106	106A	107	108	109	110							
K	L	T	V	L	G	O	P	K							
AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG							

FIG. 20

Secuencia de MSI 19-D10 **V_K**

FR 1 -----														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAC	ATC	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	GAC	TCC	CTG	GCT	GTG	TCT	CTG
D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L
-----/ CDR1 -----														
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C
GGC	GAG	AGG	GCC	ACC	ATC	AAC	TGC	AAG	TCC	AGC	CAG	AGT	GTT	TTA
G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L
-----/ FR2 -----														
27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
TAC	AGC	TCC	AAC	AAT	AAG	AAC	TAC	TTA	GCT	TGG	TAC	CAG	CAG	
Y	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	
-----/ CDR2 -----														
39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	TAC	TGG	GCA	TCT	ACC
K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T
-----/ FR3 -----														
54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
CGG	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGG
R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
-----/ CDR3 -----/ FR4 -----														
69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	GCT	GAA	GAT	GTG
T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V
-----/ CDR3 -----/ FR4 -----														
84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	TAT	TAT	AGT	ACT	CCT	CTC	ACT	TTC
A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	T	F
-----/ C_K -----														
99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
GGC	CCT	GGG	ACC	AAA	GTG	GAT	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	GCA	CCA
G	P	G	T	K	V	D	I	K	R	T	V	A	A	P

FIG. 21A

Glía primaria mixta
respuesta sH-IgM.22 Ca^{2+}

- prop. cél. n°1
- prop.cél.n°2
- △ sH-IgM.22 ($3\mu\text{g/ml}$)
- ▲ Br-A23187 ($10\mu\text{M}$)

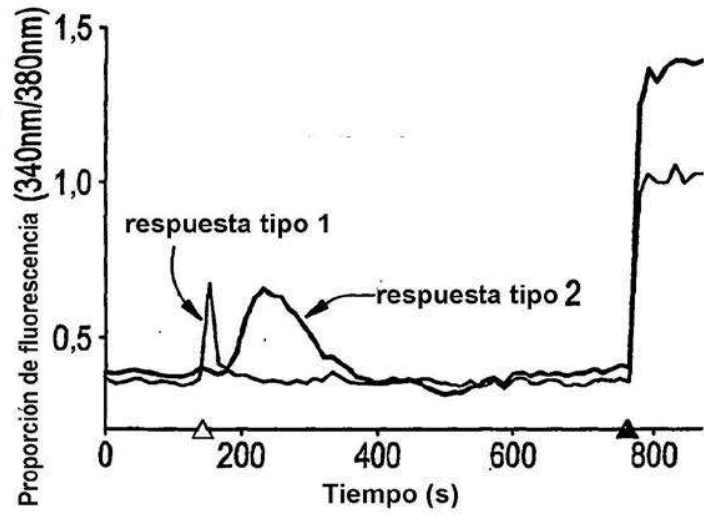


FIG. 21B

Glía primaria mixta
respuesta SCH 94.03 Ca^{2+}

- prop. cél. n°1
- prop.cél.n°2
- △ SCH 94.03 ($3\mu\text{g/ml}$)
- ▲ Br-A23187 ($10\mu\text{M}$)

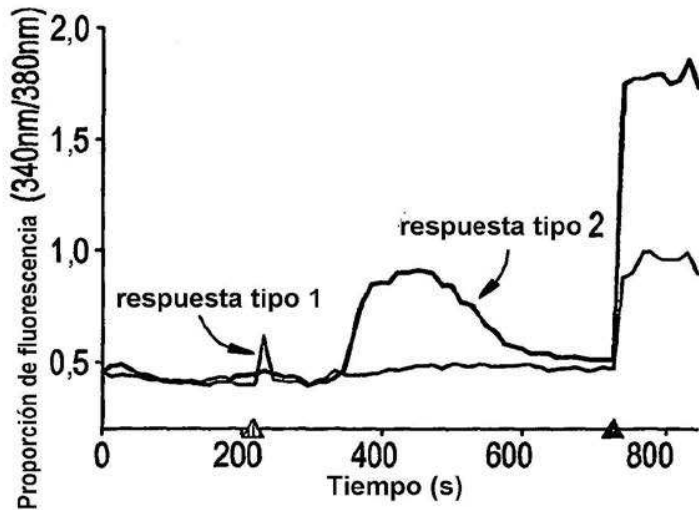


FIG. 21C

Glía primaria mixta
respuesta CH 12/sH-IgM.14 Ca^{2+}

- prop. cél. n°1
- prop.cél.n°2
- △ CH 12 ($3\mu\text{g/ml}$)
- △ sH-IgM.14 ($3\mu\text{g/ml}$)
- ▲ Br-A23187 ($10\mu\text{M}$)

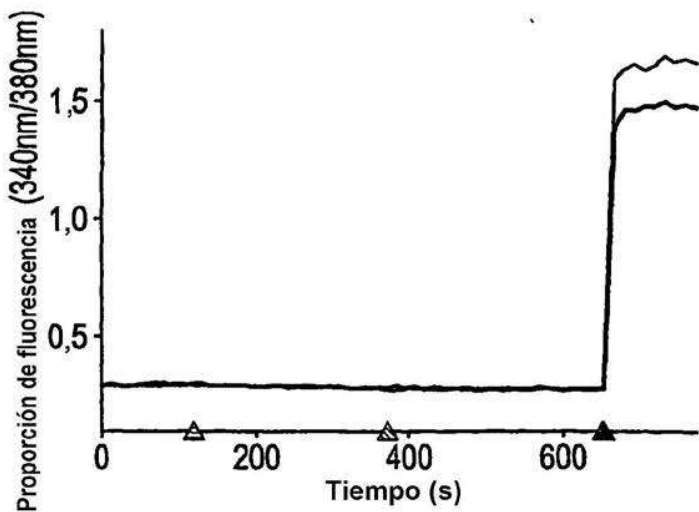


FIG. 22A

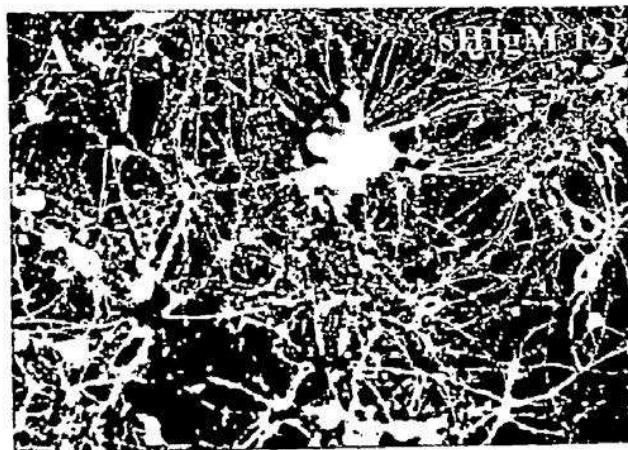


FIG. 22B

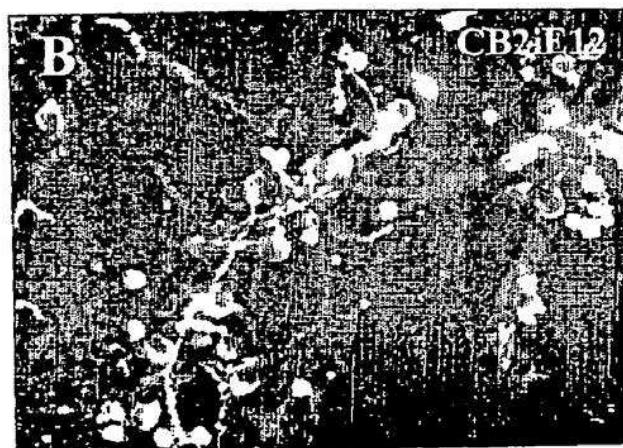


FIG. 23

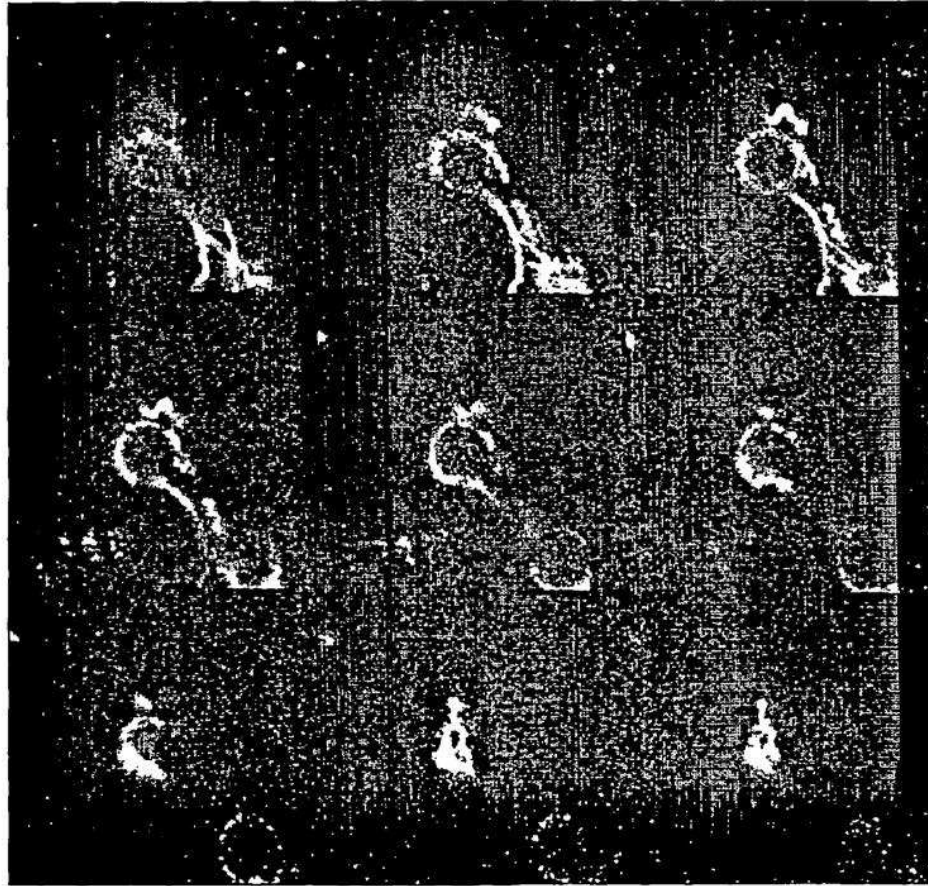


FIG. 24A

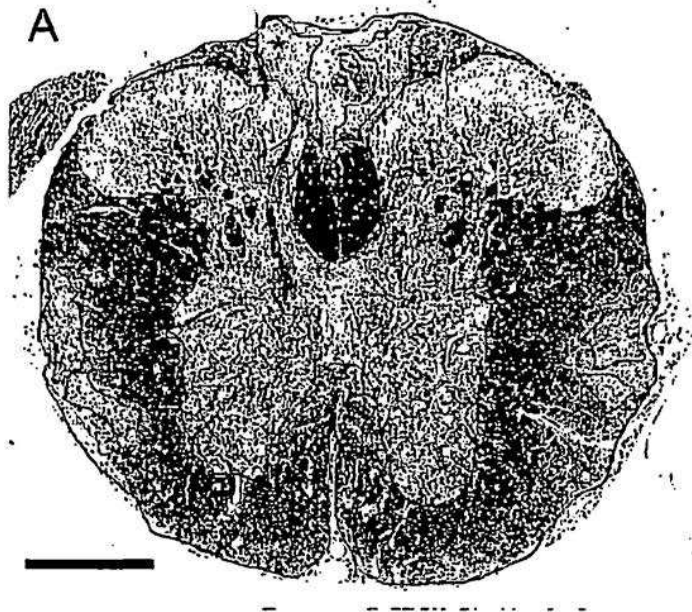


FIG. 24B

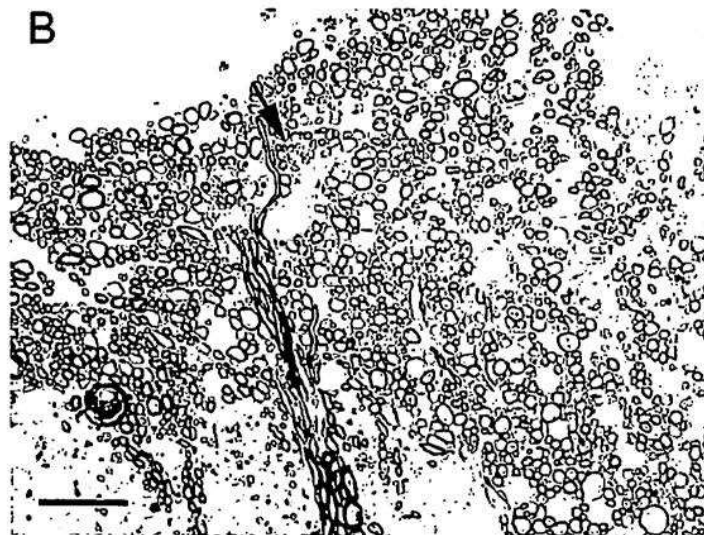


FIG. 25A

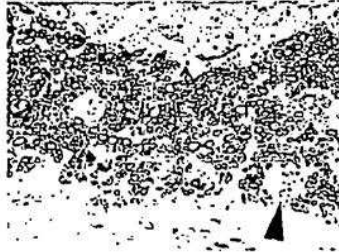


FIG. 25B

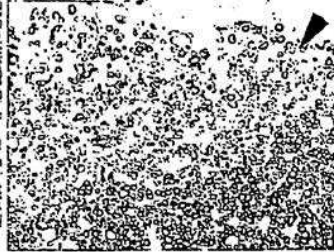


FIG. 25C

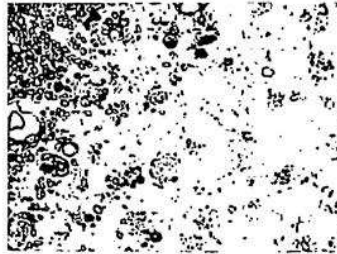


FIG. 25D

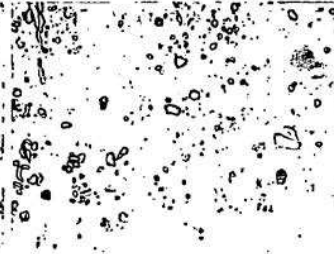


FIG. 25E

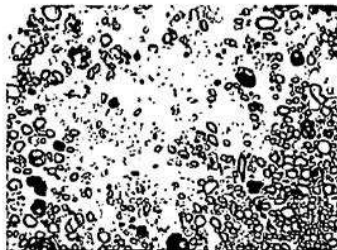


FIG. 25F

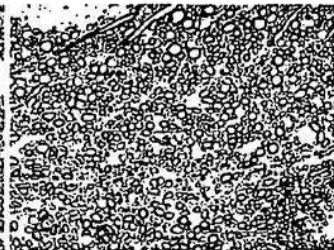


FIG. 25G

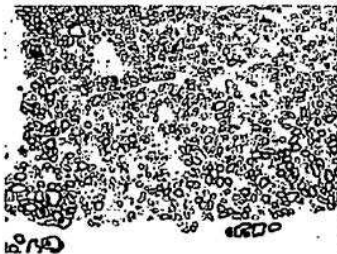


FIG. 25H

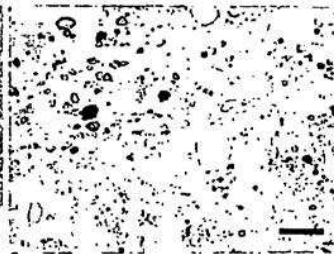


FIG. 26A

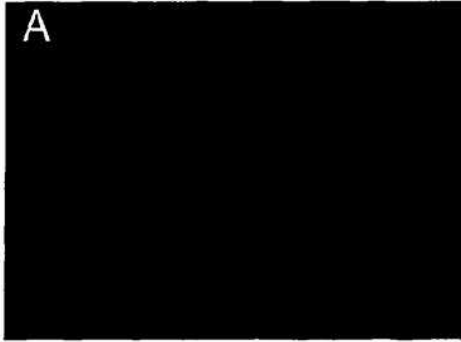


FIG. 26B

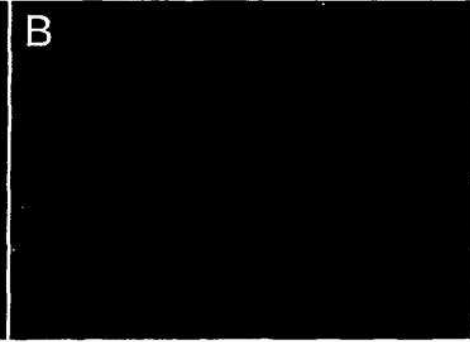


FIG. 26C



FIG. 26D

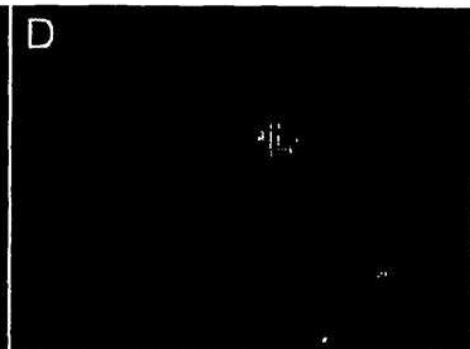


FIG. 27A

Traducción de CB2b-G8 V_x:

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1      5      10      15      20
      x      A V V Q P G R S L R L S
      . . . . .AG . . . GCC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC

----->
25      30      35      40
C A A S G F I F S S Y G M H W V R Q
TGT GCA GCG TCT GGA TTC ATT TTC AGT AGC TAT GGC . . . . .ATG CAC TGG GTC CGC CAG

----->
F R 2 - I M G T ----->
45      50      55      60      65
V P G K G L E W V A V I W Y D G S D K Y
GTT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT GAT AAA . . . . .TAC

```

FIG. 27B

-----										F	R	3	-	I	M	G	T	----			
70	Y	V	D	S	V	K	75	80	85												
	TAT	GTA	GAC	TCC	GTG	AAG	... GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCT	AAA	AAC	ACG	CTC	TAT

↑

L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	D	R	S
CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	CGC
90						95					100				105				110

CDR3 - IMGT																		
G	W	Y	W	S	C	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	I	V	S	S
GGC	TGG	TAC	TGG	TCC	TGC	GAC	TCC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ATT	GTC	TCC	TCA

FIG. 28A

Traducción de CB2b-G8 V_λ

```

<----- F R I - I M G T ----->
1      5      x x x L      L S G S P G Q S I T I S
      .TT XGC CTC ... CTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC

----->                                     <----->
      25      30      CDR1 - IMGT      35      40
C T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q
CTG ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TAT AAC TAT ... GTC TCC TGG TAC CAA CAG

F R 2 - I M G T ----->                                     CDR2 - IMGT <---
45      50      55      60      65
H P G K A P K L M I Y D V S D
CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT ... GAT

```

FIG. 28B

```

-----F R 3 - I M G T -----
70 R P S G V S N R F S G S K S G N T A S
CGG CCC TCA GGG GTT TCT ... AAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG ... TCT GGC AAC ACG GCC TCC

----->
90 L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S
CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT ACA AGC AGC

100 CDR3 - IMGT
105
110
115
120
125
130 S S V V F G G G T K L T V L G Q P K A A P S
AGC TCT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG

V T L F P P P x
GTC ACT CTG TTC CCG CCT CCA AXG G

```


FIG. 29A

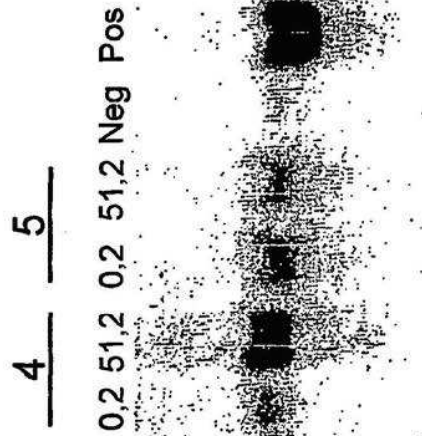


FIG. 29B

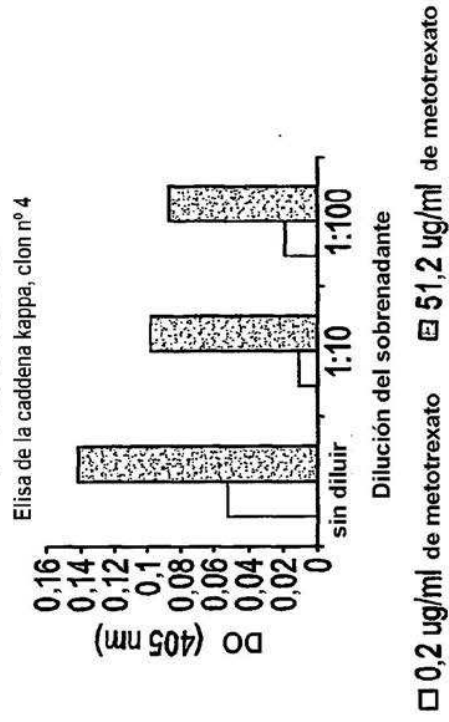


FIG. 29C

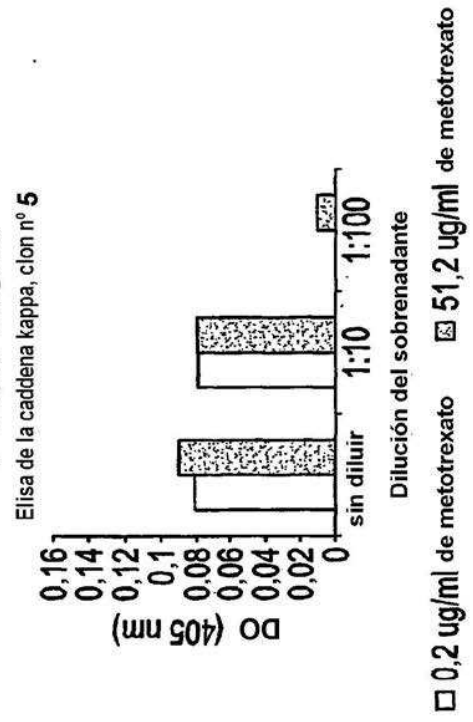


FIG. 30A

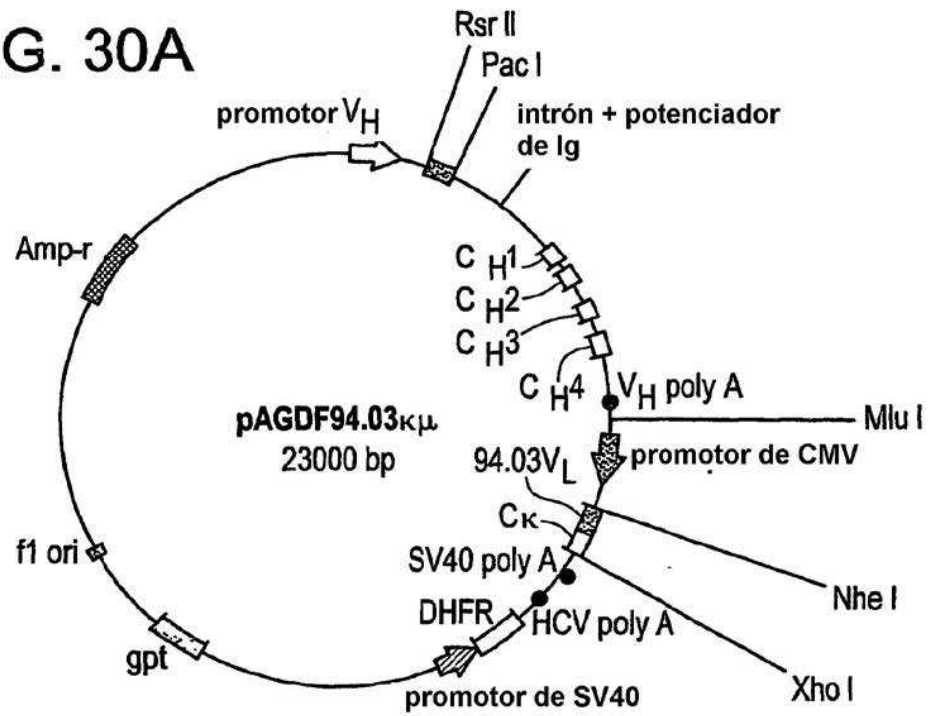


FIG. 30B

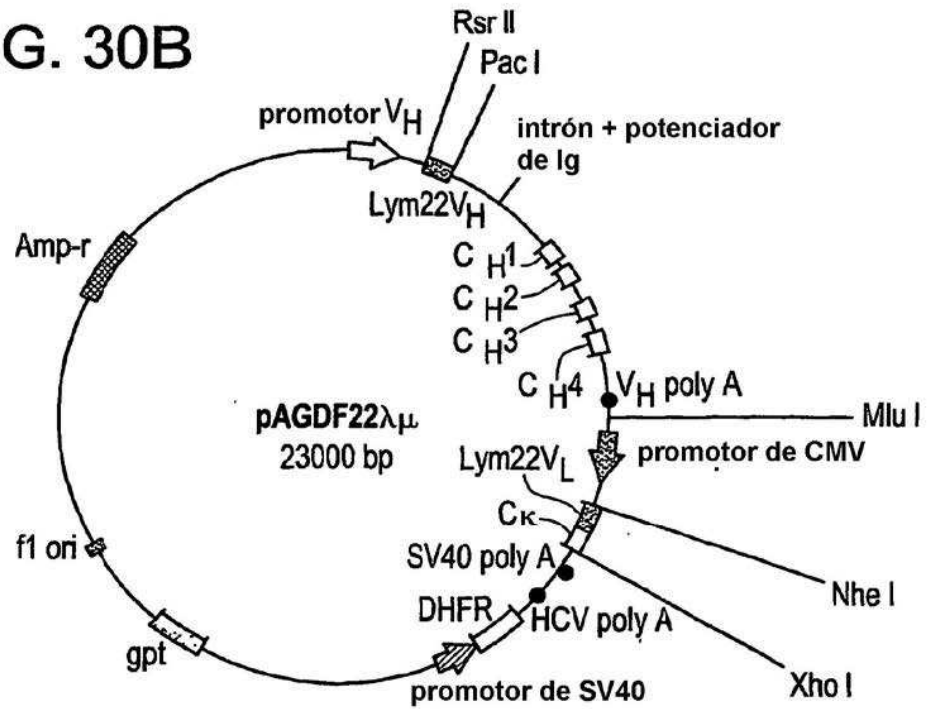
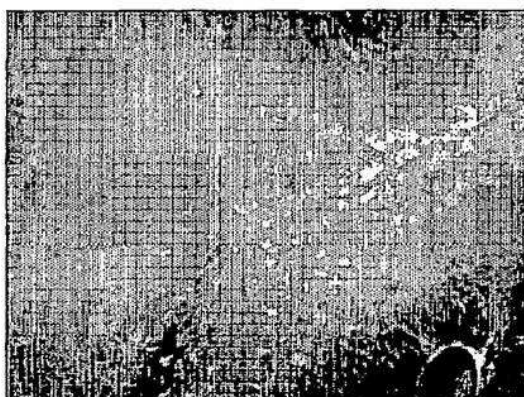


FIG. 31A



ratón 94.03

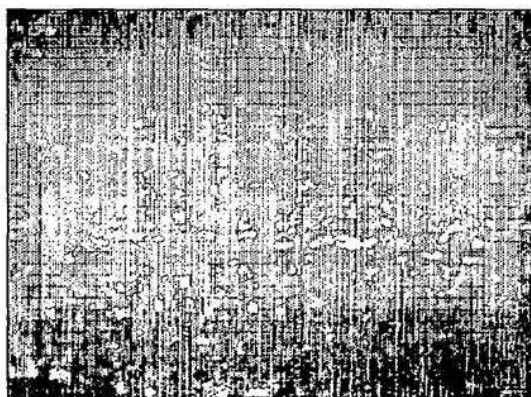
FIG. 31B



humanizado 94.03

clon 1

FIG. 31C



humanizado 94.03

clon 2

FIG. 32A

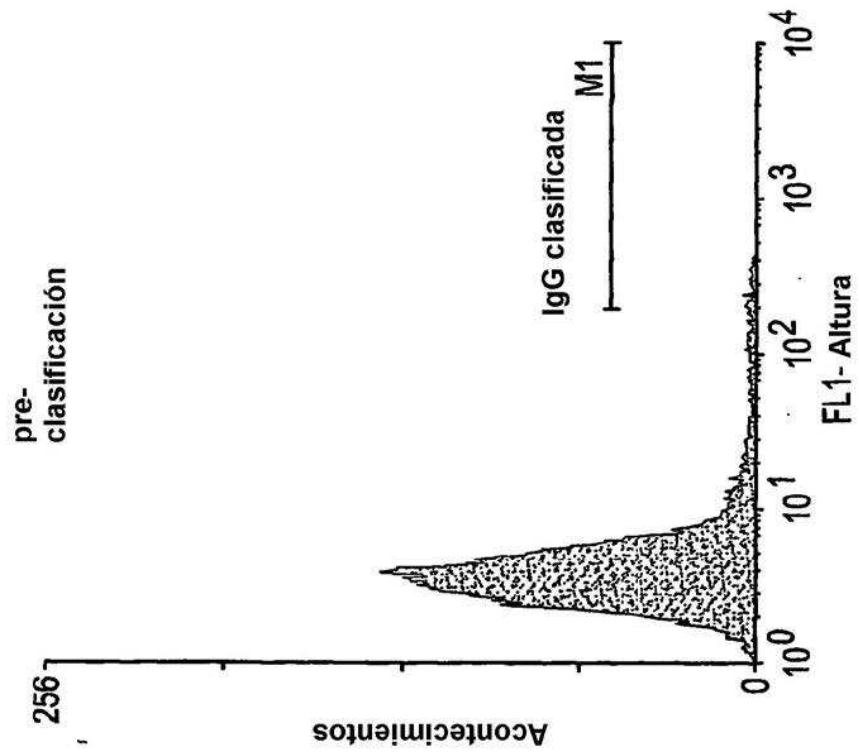


FIG. 32B

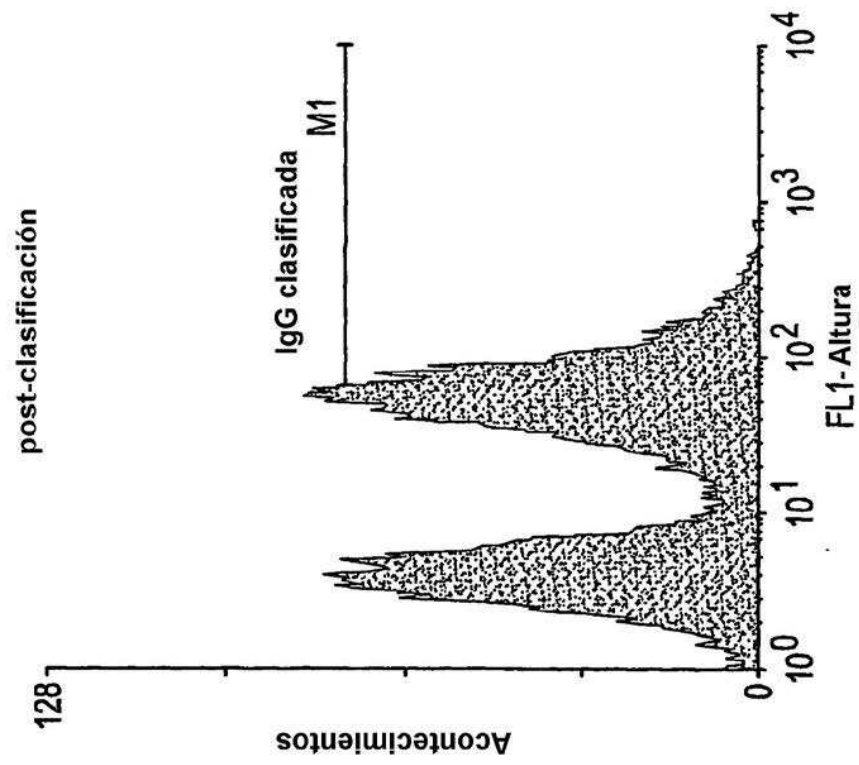
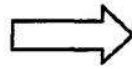
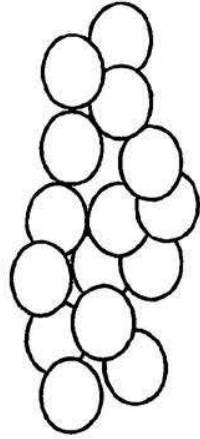


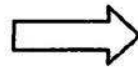
FIG. 33

Secuenciación de 94.03 IgG

94.03 IgG Células clonadas



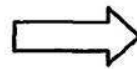
ARNm AAAAAAAA



94.03 cebador

ADNc

TTTTTT



cebador de IgG1

TTTTTT

ATGCAGTTAACAATGCTAACTGAATGCTTCCAG

Secuencia con 94.03 región V plus IgG1

FIG. 34A

Secuencia con traducción de 09 V_H

```

<----- F R I - I M G T ----->
1 5 10 15 20
  D H L Q Q S G P E L V K P G A F V K I S
CAG GAT CAC CTG CAG CAG TCT GGA CCT ...GAG CTG GTG AAG CCT GGT GGT TTT GTG AAG ATA TCC

----->
25 30 35 40
  C K A S G Y T F T N Y D L N W V R Q
TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTC ACA AAC TAC GAT ...CTA AAC TGG GTG AGG CAG

F R 2 - I M G T -----> <---
45 50 55 60 65
  R P G Q G L E W I G W I Y P G N D N T K
AGG CCT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATT TAT CCT GGA AAT GAT AAT ACT ...AAG

```

FIG. 34B

```

-----F R 3 - I M G T --
      70      75      80      85
Y N E K F K G L A S L T A D K S S T T A Y
TAC AAT GAG AAG TTC AAG ...GGC CTG GCC TCA CTG ACT GCA GAC AAG TCC ACC ACA GCC TAC

----->
      90      95      100      105      110
L H L S S L T S E S S A V Y F C A R G L P R
TTG CAT CTC AGC AGC CTG ACT TCT GAG AGC TCT GCA GTC TAT TTC TGT GCA AGA GGG TTA CCT AGG

CDR3 - IMGT      115      120
G W Y F D V W G A G T T V T V S S A
GGC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT

```

FIG. 35A

Traducción de la cadena ligera kappa 09 1:

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1  N I V M T Q S P K S M S 15 20
AAC ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AAA TCC ATG TCC ATG TCA GTA GGA GAG AGG GTC ACC TTG ACC

-----> <----->
25 C K A S E N V T Y 35 40
TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GTT ACT TAT ... GTT TCC TGG TAT CAA CAG

F R 2 - I M G T -----> <----->
45 K P E Q S P K L L I Y G A S 55 60 65
AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA TAC GGG GCA TCC ... AAC

```


-----										F	R	3	-	I	M	G	T	----			
70										75		80		85							
R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S		A	T	D	F	T		
CGG	TAC	ACT	GGG	GTC	CCC	...	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	...	TCT		GCA	ACA	GAT	TTC	ACT
-----										----->											
90										95		100		105		CDR3 -		IMGT			
L	T	I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	D	Y	H	C	G	Q	G	Y	S	Y
CTG	ACC	ATC	AGC	AGT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTT	GCA	GAT	TAT	CAC	TGT	GGA	CAG	GGT	TAC	AGC	TAT
-----										115											
P	Y	T	F	G	G	G															
CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG															

FIG. 36A

Traducción de la cadena ligera kappa 09 2:

```

<----- F R I - I M G T ----->
1 5 10 15 20
  D V Q I T Q S P S Y L A A F P G E T I T I N
  GAT GTC CAG ATA ACC CAG TCT CCA TCT TAT CTT GCT GCA TTT CCT GGA GAA ACC ATT ACT ATT AAT
----->
25 30 35 40
  C R A S K S I S K Y L A W Y Q E
  TGT AGG GCA AGT AAG AGC ATT AGT AAA TAT ... TTA GCC TGG TAT CAA GAG
----->
F R 2 - I M G T ----->
45 50 55 60 65
  R P G K T N K L L I Y S G S T
  AGA CCT GGA AAA ACT AAT AAG CTT CTT ATC TAC TCT GGA TCC ... ACT
  
```

115
P Y T F G G G
CCG TAT ACG TTC GGA GGG GGG

[illegible]

FIG. 37

Traducción de la cadena pesada AKJR 4

```

<----- F R I ~ I M G T ----->
1 5 10 15 20
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S
GAG GTG CAA CTA TTG GAA TCT GGG GGA ... GGC TTG GTA CAG CCT GGG TCC CTG AGA CTC TCC

----->
25 30 35 40
C A A S G F S F I D Y A M S W V R Q
TGT GCA GCC TCT GGA TTC AGC TTT ATC GAC TAT GCC ... ATG AGC TGG GTC CGC CAG

F R - I M G T -----> CDR2 - IMGT <----
45 50 55 60 65
A P G K G L E W V S L S G D S G S S Y
GCT CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG GTC TCA AGT CTT AGT GGT GAT AGT GGT AGT TCA ... TAT

----- F R 3 - I M G T ----->
70 75 80 85
Y A D S V K G R F T I S R D N S K S T V F
TAT GCA GAC TCC GTG AAG ... GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AGC ACG GTG TTT

----->
90 95 100 105 110
L Q L S S L R A E D T A I Y Y C A Q E T G P
CTG CAA CTG AGC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG ACC ATA TAT TAC TGT GCG CAG GAG ACC GGT CCC

-----> CDR3 - IMGT
115 120 125 130
Q R R W G Q G T L V T V S S G S A S A P T L
CAG CGT CGC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC CTG TCC TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC CTT

```

FIG. 38

Traducción de la cadena ligera kappa AKJR 4

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1  D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T
   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT

----->
25  C R A S Q S I S S W
    TGC CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGC TGG ... .. TTG GCC TGG TAT CAG CAG

   CDR1 - IMGT 30 35 40
   L A W Y Q Q

F R 2 - I M G T ----->
45  K P G K A P K L L I Y K A F
   AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAA CTC CTG ATC TAT AAG GCG TTT ... .. AAT

   CDR2 - IMGT 55 60 65
   F R 3 - I M G T ----->

70  L E S G V P S R F R G S G
   TTA GAA AGT GGG GTC CCA ... TCA AGG TTC AGA GGC AGT GGC ... TCT GGG ACA GAA TTC ACT

----->
90  L T I S S L Q P D D S A T Y Y C Q Q Y S S Y
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TCT GCA ACT TAT TAC TGC CAG CAG TAT AGT AGT TAC

   CDR3 - IMGT 95 100 105 110
   P L T F G G G T K V D I K R T V A A P S V F
   CCC CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAC ATT AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC

115
120
125
130

```

FIG. 39 Traducción de la cadena pesada CB2i-E12

```

<----- F R I - I M G T ----->
1      5      10      15      20
      X R      X X X K X E A S V K V S
      ... .. .CC AGG ... XAG XAX AXG AAA XCG GAG GCC TCA GTG AAG GTC TCC
----->
25      30      35      40
C K A S G Y T F T G Y Y      M H W V R Q
TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC GGC TAC TAT ... .. ATG CAC TGG GTG CGA CAG
F R 2 - I M G T ----->
45      50      55      60      65
A P G Q G L E W M G W I N P N S G G T      N
GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC CCT AAC AGT GGT GGC ACA ... AAC
----->
70      75      80      85
Y A Q K F Q      G R V T M T R D T S I S T A Y
TAT GCA CAG AAG TTT CAG ... GGC AGG GTC ACC ATG ACC AGG GAC ACC TCC ATC AGC ACA GCC TAC
----->
90      95      100      105      110
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R D R S Y
ATG GAG CTG AGC AGG CTG AGA TCT GAC GAC ACC GGC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGA TCG TAT
CDR3 - IMGT
115      120      125
P G R N Y F D Y W G Q G T L V T
CCG GGA AGG AAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

```

FIG. 40 Traducción de la cadena kappa CB2i-E12

```

<----- F R I - I M G T ----->
1  E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S
   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC
----->
25  C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q
   TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC ... TTA GCC TGG TAC CAG CAG
   F R 2 - I M G T ----->
45  K P G Q A P R L L I Y G A S
   AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC ... AGC
   ----- F R 3 - I M G T ----->
70  R A T G I P D R F S G S G S G T D F T
   AGG GCC ACT GGC ATC CCA ... GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG ... TCT GGG ACA GAC TTC ACT
----->
90  L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S
   CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCT
   ----- CDR3 - IMGT ----->
115 H T F G Q G
    CAC ACT TTT GGC CAG GGG

```

132

FIG. 42 Traducción de la cadena kappa CB21-E7

```

<----- F R 1 - I M G T -----
1  D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T
   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT
----->
25  C R A S Q G I S N Y 30  CDR1 - IMGT 35  L A W Y Q Q
   TGC CGG GCG AGT CAG GGC ATT AGC AAT TAT ... TTA GCC TGG TAT CAG CAG
F R 2 - I M G T ----->
45  K P G K V P K L L I Y A A S 55  CDR2 - IMGT 60  T
   AAA CCA GGG AAA GTT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ... ACT
----->
70  L Q S G V P S R F N G S G 80  S G T D F T
   TTG CAA TCA GGG GTC CCA ... TCT CGG TTC AAT GGC AGT GGA ... TCT GGG ACA GAT TTC ACT
----->
90  L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q K Y N K C
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAA CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AAG TAT AAC AAG TGC
----->
115 P S H F R G R D
     CCC TCT CAC TTT CGG GGG AGG GAC

```

FIG. 43A

Traducción de la cadena ligera MSI 19-E5

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
      5      10      15      20
1  D I A M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
   GAC ATC GCG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCA GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC
----->
      25      30      35      40
   C K S S R S V L F S S N N N Y L A W Y Q Q
   TGC AAG TCC AGC CGG AGT GTT TTA TTC AGC TCC AAC AAT AAC AAC TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG
F R 2 - I M G T ----->
      45      50      55      60      65
   K P G Q P P K L L I Y W A S
   AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTA CTC ATT TAC TGG GCA TCT ... .. ACC
      CDR1 - IMGT      CDR2 - IMGT

```

FIG. 43B

```

-----
              70      75      80      85
R   E   S   G   V   P       D   R   F   S   G   S   G       S   G   T   D   F   T
CGG GAA TCC GGG GTC CCT ... GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG ... ... TCT GGG ACA GAT TTC ACT

----->
              90      95      100      105      110
L   T   I   S   S   L   Q   A   E   D   V   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   Y   S   T
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA TAT TAT AGT ACT

MGT

P   I   T   F   G
CCA ATC ACC TTC GGC

```

FIG. 44

Traducción de la cadena kappa 09 2:

```

<----- F R 1 - I M G T ----->
1  D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T
   GAC ATC GTA ATG ACG CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACT TCA GTA GGA AGG GTC AGC ATC ACC

----->
      25          30          35          40
C K A S Q D V S T A          V A W Y Q Q
TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG AGT ACT GCT ... ... GTA GCC TGG TAT CAA CAG

F R 2 - I M G T ----->
      45          50          55          60
K P G Q S P K L L I Y S A S          Y
AAA CCA GGA CAA TCT CCT CCA CTA CTG ATT TAC TCG GCA TCC ... ... TAC

----- F R 3 - I M G T -----
      70          75          80          85
R Y T G V P          D R F T G S G          S G T D F T
CGG TAC ACT GGA GTC CCT ... GAT CGC TTC ACT GGC AGT GGA ... ... TCT GGG ACG GAT TTC ACT

----->
      90          95          100          105          110
F T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q Q H Y T T
TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT ACT ACT

----->
      115
P L T F G A G
CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG

```