

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 015**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2004 E 10171533 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2248899**

54 Título: **Proteína de unión del receptor de NOGO**

30 Prioridad:

19.03.2003 US 455756 P
20.06.2003 US 480241 P
01.08.2003 US 492057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2015

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
250 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

MI, SHA;
MCCOY, JOHN;
PEPINSKY, R. BLAKE;
LEE, DANIEL H. S. y
LUGOVSKOY, ALEXEY A.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 537 015 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína de unión del receptor de NOGO

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la neurología, la neurobiología y la biología molecular. Más concretamente, esta invención se refiere a moléculas y métodos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones neurológicas tales como lesiones de la médula espinal.

Antecedentes de la invención

10 Los axones y las dendritas se extienden desde las neuronas. La punta distal de un axón o neurita en extensión incluye una región especializada, conocida como cono de crecimiento. Los conos de crecimiento detectan el entorno local y guían el crecimiento axonal hacia la célula diana de una neurona. Los conos de crecimiento responden a señales ambientales, por ejemplo, adhesividad de la superficie, factores de crecimiento, neurotransmisores y campos eléctricos. Los conos de crecimiento generalmente avanzan a una velocidad de uno a dos milímetros por día. El cono de crecimiento explora el área delante del mismo y a cada lado, por medio de elongaciones clasificadas como lamelipodios y filopodios. Cuando una elongación entra en contacto con una superficie desfavorable, se retira.

15 Cuando una elongación entra en contacto con una superficie de crecimiento favorable, continúa extendiéndose y guía el cono de crecimiento en esa dirección. Cuando el cono de crecimiento alcanza una célula diana apropiada se crea una conexión sináptica.

20 La función de las células nerviosas está influenciada por el contacto entre las neuronas y otras células en su entorno inmediato (Rutishauser, et al., 1988, *Physiol. Rev.* 68:819). Estas células incluyen células gliales especializadas, oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC), y células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP), que envuelven el axón neuronal con mielina (Lemke, 1992, en *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., pág. 281, Sinauer).

25 Las neuronas del SNC tienen el potencial inherente para regenerarse después de la lesión, pero este potencial resulta inhibido por proteínas inhibitoras presentes en la mielina (Brittis et al., 2001, *Neuron* 30:11-14; Jones et al., 2002, *J. Neurosci.* 22:2792-2803; Grimpe et al., 2002, *J. Neurosci.* 22:3144-3160).

30 Se han caracterizado varias proteínas inhibitoras de mielina encontradas en los oligodendrocitos. Los ejemplos conocidos de proteínas inhibitoras de mielina incluyen NogoA (Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444), Glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (McKerracher et al., 1994, *Neuron* 13:805-811; Mukhopadhyay et al., 1994, *Neuron* 13:757-767) y la glicoproteína de oligodendrocitos (OM-gp), Mikol et al., 1988, *J. Cell. Biol.* 106:1273-1279). Se ha demostrado por separado que cada una de estas proteínas es un ligando para el NgR1 neuronal (Wang et al., *Nature* 2002, 417, 941-944; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., *Neuron* 2002, Publicado en Internet el 28 de Junio de 2002).

35 El receptor de Nogo 1 (NgR1) es una proteína de membrana anclada a GPI que contiene 8 repeticiones ricas en leucina (Fournier et al., 2001, *Nature* 409:341-346). Tras la interacción con las proteínas inhibitoras (p. ej., NogoA, MAG y OM-gp), el complejo NgR1 transduce señales que conducen a un colapso del cono de crecimiento y la inhibición de la proyección de las neuritas. El documento WO 01/12662 hace referencia a proteínas asociadas a la membrana humanas (MEMAP) y polinucleótidos que identifican y codifican MEMAP.

40 Existe una necesidad no satisfecha de moléculas y métodos para inhibir el colapso de los conos de crecimiento mediado por NgR1 y la inhibición resultante de la proyección de las neuritas.

Compendio de la invención

45 Los autores de la presente invención han realizado varios descubrimientos referentes a un polipéptido denominado "Sp35" (denominación de los autores de la presente invención). Denominaciones alternativas para Sp35 incluyen "LINGO" y "LINGO-1". Los descubrimientos de los autores de la presente invención incluyen los siguientes. Sp35 se une a NgR1. Sp35 se une a sí mismo en una interacción homotípica. Una proteína de fusión Sp35-Fc induce o promueve la fasciculación en las neuronas granulares. Una proteína de fusión Sp35-Fc promueve la supervivencia neuronal tanto en el modelo de lesión de hemisección del conducto rubro espinal como en el modelo de transección del nervio óptico. Las células primarias corticales infectadas con retrovirus con Sp35, cuando son liberadas en ratas con lesiones en la médula espinal, dan como resultado un aumento de la supervivencia neuronal, un aumento de la tinción de la tubulina β III de los axones, y un incremento del contenido de mielina.

50

Basándose en parte en estos descubrimientos, la presente descripción ofrece un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en donde: (a) el polipéptido incluye (i) un dominio LRR de Sp35, (ii) una región alcalina de Sp35 C-terminal con respecto al dominio LRR, y (iii) un dominio de inmunoglobulina (Ig) de Sp35 C-terminal con respecto a la región alcalina; y (b) el polipéptido carece de un dominio transmembrana.

El dominio LRR de Sp35 puede contener un LRR carboxi-terminal (LRRCT), un LRR amino-terminal (LRRNT), o ambos. En algunos casos de la descripción, el polipéptido Sp35 codificado carece del dominio citoplásmico. En algunos casos, el polipéptido Sp35 codificado incluye los residuos de aminoácido 34 a 532 del SEQ ID NO: 2 y carece de los residuos de aminoácido 533-614.

- 5 La presente descripción también incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido en donde el polipéptido incluye un dominio Ig de Sp35 y carece de un dominio LRR de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

La presente descripción también incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido en donde el polipéptido incluye un dominio LRR de Sp35 y carece de un dominio Ig de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

La presente descripción también incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido que carece de un dominio citoplásmico funcional, pero que incluye todos los demás dominios de Sp35. Por ejemplo, el polipéptido codificado podría incluir los aminoácidos 1-576 del SEQ ID NO: 2 (antes del procesamiento de la secuencia señal).

- 15 En algunos casos de la descripción, el polipéptido codificado es un polipéptido de fusión que contiene un radical no de Sp35. El radical no de Sp35 puede ser, por ejemplo, un radical Ig, un radical de albúmina de suero, un radical de direccionamiento, un radical informador, o un radical que facilita la purificación. Un radical no de Sp35 preferido es un radical de Ig, por ejemplo, un radical de Fc.

La secuencia de nucleótidos puede estar conectada operativamente a una secuencia de control de la expresión, por ejemplo, en un vector de expresión. La presente descripción también incluye una célula anfitriona transformada con un vector que expresa un polipéptido Sp35 de la descripción.

La presente descripción también incluye un polipéptido Sp35 codificado por cualquiera de los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

- 25 La presente descripción también incluye un polipéptido Sp35 conjugado con un polímero, p. ej., un polialquilenglicol, un polímero de azúcar, y un polipéptido. Un polímero preferido es un polialquilenglicol, p. ej., polietilenglicol (PEG). El polipéptido puede estar conjugado con 1, 2, 3 ó 4 polímeros. Preferiblemente, el peso molecular total de los polímeros conjugados es de 20.000 Da a 40.000 Da por polipéptido Sp35.

La presente descripción también incluye un método para inhibir la transducción de señales por NgR1. El método incluye poner en contacto el NgR1 con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35. Los polipéptidos preferidos para su uso en el método incluyen los siguientes:

- 30 (a) un polipéptido Sp35, en donde: (a) el polipéptido incluye (i) un dominio LRR de Sp35, (ii) una región alcalina de Sp35 C-terminal con respecto al dominio LRR, y (iii) un dominio inmunoglobulina (Ig) de Sp35 C-terminal con respecto a la región alcalina; y (b) el polipéptido carece de un dominio transmembrana; y

(b) un polipéptido Sp35 que incluye un dominio Ig de Sp35 y carece de un dominio LRR de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

- 35 La presente descripción también incluye un método para disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC). El método incluye poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido tal como un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

La presente descripción también incluye un método para inhibir el colapso del cono de crecimiento de una neurona del SNC. El método incluye poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido tal como un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

La presente descripción también incluye un método para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC en un mamífero. El método incluye administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido tal como un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

- 45 En algunos casos de la descripción, las enfermedad, trastorno o lesión del SNC es una lesión de la médula espinal. El polipéptido Sp35 se puede administrar localmente. En algunos casos del método, el polipéptido Sp35 se administra inicialmente en el plazo de 48 horas de una lesión de la médula espinal. Para la administración local, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido es preferiblemente de 10 µg/kg y 10 mg/kg. Para la administración sistémica, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido es preferiblemente de 1 mg/kg a 20 mg/kg.

- 50 La presente descripción también incluye un método de terapia génica ex vivo para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC en un mamífero. El método incluye (a) proporcionar una célula anfitriona cultivada que expresa un polipéptido Sp35 recombinante; y (b) introducir la célula anfitriona en el mamífero en el lugar de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC, p. ej., lesión de la médula espinal. La célula anfitriona cultivada se puede obtener a partir del mamífero que se vaya a tratar. En este método de terapia génica ex vivo, el polipéptido Sp35 recombinante

puede ser un polipéptido Sp35 completo.

La presente descripción también incluye un método para promover la mielinización en el sitio de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC. El método incluye poner en contacto el sitio de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35, p. ej., un polipéptido que contiene un dominio LRR de Sp35 y que carece de un dominio Ig de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

La presente descripción también incluye un método de terapia génica *in vivo* para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC mediante terapia génica *in vivo*. El método incluye las etapas de administrar a un mamífero, en o cerca del lugar de la enfermedad, trastorno o lesión, un vector viral que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Sp35 de modo que el polipéptido Sp35 sea expresado a partir de la secuencia de nucleótidos en el mamífero en una cantidad suficiente para reducir la inhibición de la extensión axonal por las neuronas en o cerca del sitio de la lesión. El vector viral puede ser, p. ej., un vector adenoviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papovaviral, un vector viral de vaccinia, y un vector viral de herpes simplex. La enfermedad, trastorno o lesión pueden ser, p. ej., una lesión de la médula espinal o una lesión del nervio óptico. El vector viral se puede administrar por una ruta, tal como la administración tópica, administración intraocular, administración parenteral, administración intratecal, administración subdural y administración subcutánea.

La presente descripción también incluye un método para promover la supervivencia de una neurona en riesgo de muerte. El método incluye poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35. El polipéptido Sp35 puede ser una forma soluble de Sp35, p. ej., una proteína de fusión Sp35-Fc. La neurona puede estar *in vitro* o *in vivo*, p. ej., en un mamífero con una enfermedad, trastorno o lesión neurodegenerativos, p. ej., esclerosis múltiple, ELA, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, ictus, lesiones cerebrales traumáticas y lesión de la médula espinal. En algunos casos de la descripción, el polipéptido Sp35 se administra indirectamente: (a) proporcionando una célula anfitriona cultivada que expresa un polipéptido Sp35 recombinante; y (b) introduciendo la célula anfitriona en el mamífero en el sitio de la neurona. En algunos casos de la descripción, el polipéptido se administra indirectamente por medio de terapia génica *in vivo*. En tal caso, el método incluye administrar, en o cerca del sitio de la neurona, un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Sp35 de modo que el polipéptido Sp35 sea expresado a partir de la secuencia de nucleótidos en el mamífero en una cantidad suficiente para promover la supervivencia de la neurona.

Según se utiliza en la presente memoria, "polipéptido Sp35 humano completo" significa el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en los aminoácidos 34-614 del SEQ ID NO: 2.

Según se utiliza en la presente memoria, "radical heterólogo" significa una secuencia de aminoácidos no presente en un polipéptido Sp35 completo.

Según se utiliza en la presente memoria, "receptor de nogo 1" significa el polipéptido cuya secuencia está disponible públicamente bajo el núm. de acceso GenBank AAG53612.

Según se utiliza en la presente memoria, "polipéptido antagonista de Sp35" significa un polipéptido Sp35 que bloquea, inhibe o interfiere en la actividad biológica de Sp35 de origen natural.

Según se utiliza en la presente memoria, "región alcalina de Sp35" significa uno de los siguientes motivos de aminoácidos:

R R A R I R D R K	(SEQ ID NO: 4)
K K V K V K E K R	(SEQ ID NO: 5)
R R L R L R D R K	(SEQ ID NO: 6)
R R G R G R D R K	(SEQ ID NO: 7)
R R I R A R D R K	(SEQ ID NO: 8)

La fila superior de aminoácidos (en negrita; SEC ID NO: 4) es la secuencia de región alcalina de Sp35 preferida, mostrándose más abajo las variantes que muestran las sustituciones opcionales (SEQ ID NOS: 5, 6, 7 y 8).

Según se utiliza en la presente memoria, "proteína de fusión Sp35" significa una proteína de fusión que incluye un radical de Sp35 fusionado a un radical heterólogo.

Según se utiliza en la presente memoria, "dominio Ig de Sp35" significa los aminoácidos 433-493 del SEQ ID NO: 2, con la condición de que la secuencia pueda contener hasta cinco inserciones de aminoácidos individuales, delecciones o sustituciones conservativas de aminoácidos. Las siguientes sustituciones (numeradas basándose en el SEQ ID NO: 2) se incluyen expresamente: V por M en la posición 6; S por G en la posición 294; V por A en la

posición 348; y R por H en la posición 419.

Según se utiliza en la presente memoria, "dominio LRR de Sp35" significa un dominio que incluye de 10 a 14 de las secuencias repetitivas ricas en leucina, incluyendo LRRNT y LRRCT, enumeradas en la Tabla 1, con la condición de que pueden aparecer hasta cinco inserciones de aminoácidos, deleciones o sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de las 10-14 repeticiones ricas en leucina agregadas.

Según se utiliza en la presente memoria, "radical de Sp35" significa un fragmento biológicamente activo de un polipéptido Sp35 completo.

Según se utiliza en la presente memoria, "polipéptido Sp35" significa un radical de Sp35 o una proteína de fusión que incluye un radical de Sp35.

Basándose en la descripción contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al polipéptido del SEQ ID NO: 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurovegetativos en los que la extensión axonal podría ser beneficiosa en un mamífero, en donde el anticuerpo o el fragmento son capaces de disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC).

La presente invención también proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen al polipéptido del SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativos en los que la extensión axonal podría ser beneficiosa en un mamífero, en donde el anticuerpo o el fragmento son capaces de disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC).

Los aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. Se pretende que los materiales, métodos y ejemplos sean meramente ilustrativos, y no limitantes. Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es la secuencia de nucleótidos de un ADNc de Sp35 humano completo (SEQ ID NO: 1)

La FIG. 2 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Sp35 humano completo (SEQ ID NO: 2).

La FIG. 3 es una ilustración esquemática de la estructura del dominio Sp35 y un mapeo de deleción para identificar la secuencia o secuencias de Sp35 que se unen a NgR1.

La FIG. 4 es un histograma que resume los datos sobre Sp35 que se une a células COS7 transfectadas con un vector de expresión que codifica p75 de rata o un control de vector. Después de 48 horas, AP-Sp35 o AP se incubaron con las células. La AP unida se detectó utilizando reactivo de detección cromogénico de AP.

La FIG. 5 es un histograma que resume los datos sobre la unión de AP-OMgp, y AP-Nogo-66 a células COS7 transfectadas con un vector de expresión que codifica NgR1; NgR1 y p75; NgR1, p75, y Sp35, o un control de vector. Después de 48 horas, se incubaron AP-OMgp, AP-Nogo-66 o AP con las células. La AP unida se detectó utilizando reactivo de detección cromogénico de AP.

La FIG. 6 es un histograma que resume los datos sobre la mitigación de la actividad inhibidora de los inhibidores de mielina sobre la proyección de neuritas *in vitro*. La longitud de neuritas se midió sobre neuronas granulares de cerebelo de rata 7 días después del nacimiento que expresaban DN-Sp35, Sp35 completo, o controles cultivados sobre sustrato Omgp inmovilizado, mielina y Nogo-66. Las células transfectadas DN-Sp35 mostraron una disminución de la respuesta a los sustratos inhibidores. Longitud de las neuritas se cuantificó a partir de 1000 neuronas por grupo de tratamiento de dos experimentos independientes ($p < 0,01$).

La FIG. 7 es un histograma que resume los datos sobre la mitigación de la actividad inhibidora de los inhibidores de mielina por Sp35-Fc. La longitud de las neuritas se midió en neuronas granulares de cerebelo de rata 7 días después del nacimiento (1000 neuronas) cultivadas en sustrato inmovilizado OMgp, mielina o Nogo-66 en presencia o ausencia de Sp35-Fc. Sp35-Fc redujo la inhibición de la proyección de las neuritas causada por Omgp, Nogo-66 y MAG. La longitud de neuritas se cuantificó a partir de 1000 neuronas por grupo de tratamiento de dos experimentos independientes ($p < 0,01$).

La FIG. 8 es un gráfico que resume los datos de un experimento que demuestra que Sp35-Fc administrado intratecalmente mejora la recuperación funcional después de la hemisección dorsal en una rata. La puntuación BBB locomotora se midió como una función del tiempo después de la hemisección dorsal en ratas de control (IgG) o tratadas con Sp35-Fc (8 animales por grupo). El tratamiento se inició en el momento de la lesión de la médula espinal.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra las puntuaciones BBB de los animales individuales en la semana cuatro en el experimento resumido en la FIG. 8.

Descripción detallada de la invención

El Sp35 humano de origen natural es una proteína específica del SNC glicosilada que contiene 614 aminoácidos (FIG. 2; SEQ ID NO: 2). El polipéptido Sp35 de tipo salvaje completo, humano contiene un dominio LRR que consta de 14 repeticiones ricas en leucina (incluyendo protecciones N- y C-terminales), un dominio Ig, una región transmembrana, y un dominio citoplásmico (FIG. 3). El dominio citoplásmico contiene un sitio de fosforilación canónico de tirosina. Además, la proteína Sp35 de origen natural contiene una secuencia señal, una región alcalina corta entre el LRRCT y el dominio Ig, y una región transmembrana entre el dominio Ig y el dominio citoplásmico (FIG. 3). El gen de Sp35 humano contiene codones de inicio de la traducción alternativos, de modo que seis aminoácidos adicionales, es decir, MQVSKR (SEQ ID NO: 9) pueden estar presentes o no en el extremo N-terminal de la secuencia señal de Sp35. La Tabla 1 enumera los dominios Sp35 y otras regiones, de acuerdo con el número de residuos de aminoácido, basándose en la secuencia en la FIG. 2 (SEQ ID NO: 2).

Tabla 1

Dominio o Región	Residuo de Comienzo	Residuo de Finalización
Secuencia Señal	1	33
LRRNT	34	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	416
Alcalino	417	424

Dominio o Región	Residuo de Comienzo	Residuo de Finalización
Ig	433	493
Secuencia de Conexión	494	551
Transmembrana	552	576
Citoplásmico	577	614

La distribución tisular y la expresión evolutiva de Sp35 se han estudiado en seres humanos y ratas. La biología de Sp35 se ha estudiado en un modelo animal (rata) experimental. La expresión de Sp35 de rata se localiza en neuronas del SNC y oligodendrocitos del cerebro, según se determina por medio de transferencia Northern y tinción inmuño-histoquímica. El nivel de expresión del ARNm de Sp35 de rata está regulado evolutivamente, alcanzando un máximo poco después del nacimiento, es decir, aprox. el primer día después del nacimiento. En un modelo de lesión de transección de la médula espinal de ratas, Sp35 está regulado al alza en el sitio de la lesión, según se determina mediante RT-PCR.

Los autores de la presente invención han descubierto que Sp35 de tipo salvaje completo se une a NgR1. Los derivados solubles de Sp35 funcionan como polipéptidos antagonistas de Sp35 mediante la unión a NgR1 y bloquean, inhiben o interfieren su función, mitigando de este modo la inhibición mediada por NgR1 de la extensión axonal que normalmente tiene lugar en las neuronas del SNC. Esto es beneficioso en situaciones donde se necesita la extensión axonal o el brote de neuritas en el cerebro o la médula espinal. La lesión de la médula espinal, incluyendo aplastamiento o rotura parcial o completa, es un ejemplo de una situación en la que es necesaria la extensión axonal, pero se inhibe normalmente a través del funcionamiento de la ruta Nogo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos en los que la extensión axonal y/o el brote de neuritas en el cerebro serían beneficiosos incluyen el ictus, la esclerosis múltiple, y otras enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

En los métodos de la presente descripción, se puede administrar directamente un polipéptido Sp35 o un anticuerpo bloqueador de Sp35 (o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno) en forma de un polipéptido preformado, o indirectamente a través de un vector de ácido nucleico, para suscitar antagonismo de la función de NgR1 y permitir la proyección axonal beneficiosa.

En algunos casos de la descripción, se administra un polipéptido antagonista de Sp35 soluble en un método de tratamiento que incluye: (1) transformar o transfectar una célula anfitriona implantable con un ácido nucleico, p. ej., un vector, que expresa un polipéptido Sp35; y (2) implantar la célula anfitriona transformada en un mamífero, en el sitio de una enfermedad, trastorno o lesión. Por ejemplo, la célula anfitriona transformada puede ser implantada en el sitio de una lesión de la médula espinal. En algunos casos de la descripción, la célula anfitriona implantable se retira de un mamífero, se cultiva de manera temporal, se transforma o se transfecta con un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido Sp35 soluble, y se implanta de nuevo en el mismo mamífero del que se retiró. La célula puede ser, pero no se requiere que sea, retirada del mismo sitio en donde se implanta. Tales casos, a veces conocidos como terapia génica *ex vivo*, pueden proporcionar un suministro continuo del polipéptido Sp35, localizado en el sitio del sitio de acción, durante un período limitado de tiempo.

La presente descripción proporciona oligopéptidos útiles como moduladores de la interacción de Sp35 con NgR1 e interacciones homotópicas de Sp35. Estos oligopéptidos pueden incluir un motivo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:

L S P R K H	(SEQ ID NO: 10)
I T P K R R	(SEQ ID NO: 11)
A C P H H K	(SEQ ID NO: 12)
V S P R K H	(SEQ ID NO: 13)

La fila superior de aminoácidos (en negrita; SEC ID NO: 10) es la secuencia preferida, mostrándose más abajo las variantes que comprenden las sustituciones opcionales (SEQ ID NO: 11, 12 y 13).

A continuación se describen diversos polipéptidos Sp35 ilustrativos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-Sp35, y métodos y materiales para la obtención de estas moléculas para la práctica de la presente descripción.

Proteínas de fusión y polipéptidos conjugados

Algunos casos de la presente descripción implican el uso de un polipéptido Sp35, por ejemplo, un polipéptido antagonista de Sp35, en donde un radical de Sp35 está fusionado a un radical polipeptídico heterólogo para formar una proteína de fusión de Sp35. Las proteínas de fusión de Sp35 se pueden utilizar para lograr diversos objetivos, p. ej., aumento de la vida media en suero, mejora de la biodisponibilidad, direccionamiento *in vivo* a un tipo de órgano o tejido específico, mejora de la eficacia de la expresión recombinante, mejora de la secreción de la célula anfitriona, facilidad de purificación, y mayor avidez. Dependiendo del objetivo o de los objetivos que deban alcanzarse, el radical heterólogo puede ser inerte o biológicamente activo. Asimismo, se puede seleccionar para que se fusione de forma estable al radical de Sp35 o para que sea escindible, *in vitro* o *in vivo*. Los radicales heterólogos para lograr diferentes objetivos son conocidos en la técnica.

Como una alternativa a la expresión de una proteína de fusión de Sp35, un radical heterólogo seleccionado puede ser preformado y conjugado químicamente al radical de Sp35. En la mayoría de los casos, el radical heterólogo seleccionado funcionará de manera similar, ya se fusione o conjugue con el radical de Sp35. Por lo tanto, en la siguiente discusión de las secuencias de aminoácidos heterólogas, a menos que se indique lo contrario, se debe entender que la secuencia heteróloga puede estar unida al radical de Sp35 en forma de una proteína de fusión o en forma de un producto conjugado químico.

Los polipéptidos farmacológicamente activos tales como Sp35 a menudo presentan un rápido aclaramiento *in vivo*, lo que exige grandes dosis para alcanzar concentraciones terapéuticamente eficaces en el organismo. Además, polipéptidos más pequeños de aproximadamente 60 kDa experimentan potencialmente filtración glomerular, que a veces conduce a nefrotoxicidad. La fusión o conjugación de polipéptidos relativamente pequeños tales como fragmentos de Sp35 se pueden emplear para reducir o evitar el riesgo de dicha nefrotoxicidad. Se conocen diversas secuencias heterólogas de aminoácidos, es decir, radicales o "portadores" polipeptídicos, para el aumento de la estabilidad *in vivo*, es decir, la vida media en suero, de polipéptidos terapéuticos.

Debido a su larga vida media, amplia distribución *in vivo*, y carencia de función enzimática o inmunológica, esencialmente la albúmina de suero humana (HSA) completa, o un fragmento de HSA, es un radical heterólogo preferido. A través de la aplicación de métodos y materiales tales como los que ilustran Yeh et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1904-1908 y Syed et al., 1997, Blood 89: 3243-3252, la HSA se puede utilizar para formar una proteína de fusión o producto conjugado de Sp35 que muestra actividad farmacológica en virtud del radical de Sp35 a la vez que exhibe un aumento significativo, p. ej., de 10 veces a 100 veces mayor, de la estabilidad *in vivo*. Preferiblemente, el extremo C de la HSA se fusiona al extremo N del radical de Sp35. Puesto que la HSA es una proteína secretada de forma natural, la secuencia señal de HSA puede aprovecharse para obtener la secreción de la proteína de fusión de Sp35 al medio de cultivo celular, cuando la proteína de fusión se produce en un sistema de expresión eucariótico, p. ej., de mamífero.

En algunos casos de esta descripción se emplea un polipéptido Sp35 en donde un radical de Sp35 está fusionado a una región Fc, es decir, la porción C-terminal de una región constante de cadena pesada de Ig. Las ventajas potenciales de una fusión Sp35-Fc incluyen solubilidad, estabilidad *in vivo*, y multivalencia, p. ej., dimerización. La región Fc utilizada puede ser una región Fc de IgA, IgD, o IgG (bisagra-CH2-CH3). Alternativamente, puede ser una región Fc de IgE o IgM (bisagra-CH2-CH3-CH4). Se prefiere una región Fc de IgG, p. ej., una región Fc de IgG1 o la región Fc de IgG4. Los materiales y métodos para construir y expresar ADN que codifica fusiones de Fc son conocidos en la técnica y pueden aplicarse para obtener fusiones de Sp35 sin experimentación indebida. Algunas realizaciones de la presente descripción emplean una proteína de fusión del tipo descrito por Capon et al. en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.428.130 y 5.565.335.

La secuencia señal es un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Las secuencias señal útiles para la construcción de una inmunofusina incluyen secuencias señal de cadenas ligeras de anticuerpos, p. ej., anticuerpo 14.18 (Gillies et al., 1989, J. Immunol. Meth, 125:191-202), secuencias señal de cadenas pesadas de anticuerpos, p. ej., la secuencia señal de la cadena pesada del anticuerpo MOPC141 (Sakano et al., 1980, Nature 286:5774). Alternativamente, se pueden utilizar otras secuencias señal. Véase, p. ej., Watson, 1984, Nucleic Acids Research 12:5145). El péptido señal es escindido por lo general en el lumen del retículo endoplásmico por peptidasas señal. Esto da como resultado la secreción de una proteína inmunofusina que contiene la región Fc y el radical de Sp35.

En algunos casos, la secuencia de ADN codifica un sitio de escisión proteolítica entre el casete de secreción y el radical de Sp35. Un sitio de escisión proporciona la escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada, separando de ese modo el dominio Fc de la proteína diana. Los sitios de escisión proteolítica útiles incluyen secuencias de aminoácidos reconocidas por enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmina, trombina, factor Xa, o enteroquinasa K.

El casete de secreción puede ser incorporado a un vector de expresión replicable. Los vectores útiles incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos y similares. Un vector de expresión ilustrativo es pdC, en donde la transcripción del ADN de inmunofusina se coloca bajo el control del intensificador y promotor del citomegalovirus humano. Véase, p. ej., Lo et al., 1991, Biochim. Biophys. Acta 1088:712; y Lo et al., 1998, Protein Engineering 11:495-500. Una célula anfitriona apropiada puede ser transformada o transfectada con un ADN que

codifica un polipéptido Sp35, y se utiliza para la expresión y secreción del polipéptido Sp35. Las células anfitrionas preferidas incluyen células de hibridoma inmortales, células de mieloma, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y células COS.

- 5 Las regiones Fc de tipo salvaje, completamente intactas muestran funciones efectoras que normalmente son innecesarias y no deseadas en una proteína de fusión de Fc de acuerdo con la presente descripción. Por lo tanto, ciertos sitios de unión se eliminan preferiblemente de la región Fc durante la construcción del casete de secreción. Por ejemplo, puesto que la expresión simultánea con la cadena ligera es innecesaria, el sitio de unión para la proteína de unión de cadena pesada, Bip (Hendershot et al., 1987, Immunol. Today 8:111-114), se suprime del dominio CH2 de la región Fc de IgE, de tal modo que este sitio no interfiera en la secreción eficaz de la
- 10 inmunofusina. Asimismo, los residuos de cisteína presentes en las regiones Fc que son responsables de la unión a la cadena ligera de la inmunoglobulina deben ser eliminados o sustituidos por otro aminoácido, de tal manera que estos residuos de cisteína no interfieran en el plegamiento apropiado de la región Fc cuando ésta sea producida en formas de una inmunofusina. Las secuencias de los dominios transmembrana, tales como las presentes en IgM, se deben suprimir.
- 15 Se prefiere la región Fc de IgG1. Alternativamente, la región Fc de las otras subclases de inmunoglobulina gamma (gamma-2, gamma-3 y gamma-4) se puede utilizar en el casete de secreción. La región Fc de IgG1 de la inmunoglobulina gamma-1 utilizada preferiblemente en el casete de secreción incluye la región bisagra (al menos parte), la región CH2 y la región CH3. En algunos casos, la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1 es un Fc con CH2 suprimida, que incluye parte de la región bisagra y la región CH3, pero no la región CH2. Un Fc con CH2
- 20 suprimida ha sido descrito por Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47. En algunos casos, se utilizan las regiones Fc de IgA, IgD, IgE, o IgM.

- 25 Las proteínas de fusión de Sp35-Fc se pueden construir en varias configuraciones diferentes. En una configuración, el extremo C del radical de Sp35 se fusiona directamente al extremo N del radical de Fc. En una configuración ligeramente diferente, un polipéptido corto, p. ej., 2-10 aminoácidos, se incorpora a la fusión entre el extremo N del radical de Sp35 y el extremo C del radical de Fc. Un conector de este tipo proporciona flexibilidad conformacional, que puede mejorar la actividad biológica en algunas circunstancias. Si se conserva una porción suficiente de la región bisagra en el radical de Fc, la fusión de Sp35-Fc se dimerizará, formando de este modo una molécula divalente. Una población homogénea de fusiones de Fc monoméricos producirá dímeros bivalentes, monoespecíficos. Una mezcla de dos fusiones de Fc monoméricos que tienen cada uno una especificidad diferente
- 30 producirá dímeros bivalentes, biespecíficos.

- Se puede utilizar cualquiera de varios agentes de entrecruzamiento que contenga un grupo reactivo con amino correspondiente y un grupo reactivo con tiol para conectar Sp35 a la albúmina de suero. Los ejemplos de los conectores adecuados incluyen agentes de entrecruzamiento reactivos con amina que insertan una maleimida reactiva con tiol, p. ej., SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS y GMBS. Otros conectores
- 35 adecuados insertan un grupo haloacetato reactivo con tiol, p. ej., SBAP, SIA, SIAB. Los conectores que proporcionan un tiol protegido o no protegido para la reacción con grupos sulfhidrilo para producir un enlace reducible incluyen SPDP, SMPT, SATA y SATP. Tales reactivos están disponibles en el mercado (p. ej., Pierce Chemicals).

- 40 La conjugación no tiene que implicar el extremo N de un polipéptido Sp35 o el radical tiol en la albúmina de suero. Por ejemplo, se pueden obtener fusiones de Sp35-albúmina utilizando técnicas de ingeniería genética, en donde el radical de Sp35 se fusiona con el gen de la albúmina de suero en su extremo N-terminal, C-terminal, o ambos.

Los polipéptidos Sp35 se pueden fusionar a péptidos heterólogos para facilitar la purificación o identificación del radical de Sp35. Por ejemplo, una etiqueta de histidina se puede fusionar a un polipéptido Sp35 para facilitar la purificación utilizando medios de cromatografía disponibles en el mercado.

- 45 En algunos casos de la descripción, se utiliza un constructo de fusión de Sp35 para mejorar la producción de un radical de Sp35 en bacterias. En tales constructos se emplea una proteína bacteriana normalmente expresada y/o secretada a un nivel alto como compañero de fusión N-terminal de un polipéptido Sp35. Véanse, p. ej., Smith et al., 1988 Gen 67:31; Hopp et al., 1988, Biotechnology 6:1204; La Vallie et al., 1993, Biotechnology 11:187.

- 50 En algunos casos de la descripción, un constructo de fusión incluye un radical de Sp35 y un segundo radical de unión a NgR1 humano, p. ej., un radical de la glucoproteína oligodendrocitomieline (OMgp), un radical de glicoproteína asociada a mielina (MAG), o radical de Nogo66. Las ventajas de tales constructos incluyen el aumento de afinidad de unión a NgR1.

La secuencia de aminoácidos OMgp completa es conocida en la técnica (Núm. de acceso GenBank P23515). Los ejemplos específicos de las fusiones Sp35-OMgp incluyen los siguientes:

- 55 Sp35 (aa 34-532) + Fc de IgG1 + OMgp (residuos de aminoácido 25 a 400); y
Sp35 (aa 34-532) + HSA + OMgp (residuos de aminoácido 25 a 400).

La secuencia de aminoácidos completa de MAG es conocida en la técnica (Núm. de Acceso GenBank A61084). Los ejemplos específicos de las fusiones de Sp35-MAG incluyen los siguientes:

Sp35 (aa 34-532) + Fc de IgG1 + MAG (residuos de aminoácido 12 a 500); y

Sp35 (aa 34-532) + HSA + MAG (residuos de aminoácido 12 a 500).

- 5 La secuencia de aminoácidos de Nogo completa es conocida en la técnica (NogoA Núm. de Acceso GenBank AY102279). Los ejemplos específicos de las fusiones de Sp35-Nogo incluyen los siguientes:

Sp35 (aa 34-532) + Fc de IgG1 + Nogo66 (residuos de aminoácido NogoA 1056-1122);

Sp35 (aa 34-532) + HSA + Nogo66 (residuos de aminoácido NogoA 1056-1122);

Sp35 (aa 34-532) + Fc de IgG1 + amino Nogo (residuos de aminoácido NogoA 1-949); y

- 10 Sp35 (aa 34-532) + HSA + amino Nogo (NogoA residuos de aminoácido 1 a 949).

Mediante la fusión de un radical de Sp35 al extremo amino y carboxilo de un compañero de fusión adecuado, se pueden obtener formas bivalentes o tetravalentes de un polipéptido Sp35. Por ejemplo, un radical de Sp35 se puede fusionar los extremos amino y carboxi terminales de un radical Ig para producir un polipéptido monomérico bivalente que contiene dos radicales de Sp35. Tras la dimerización de dos de estos monómeros, en virtud del radical de Ig, se obtiene una forma tetravalente de una proteína Sp35. Tales formas multivalentes se pueden utilizar para lograr una mayor afinidad de unión para la diana. También se pueden obtener formas multivalentes de Sp35 mediante la colocación de radicales de Sp35 en tándem para formar concatámeros, que se pueden emplear solos o fusionados con un compañero de fusión tal como Ig o HSA.

Polímeros conjugados (distintos de polipéptidos)

- 20 Algunos casos de la descripción implican un polipéptido Sp35 en donde uno o más polímeros se conjugan (se unen covalentemente) al polipéptido Sp35. Los ejemplos de los polímeros adecuados para dicha conjugación incluyen polipéptidos (comentados anteriormente), polímeros de azúcares y cadenas de polialquilenglicol. Típicamente, pero no necesariamente, un polímero se conjuga con el polipéptido Sp35 con el fin de mejorar una o más de las siguientes: solubilidad, estabilidad o biodisponibilidad.

- 25 Una clase preferida de polímero para la conjugación con un polipéptido Sp35 es un polialquilenglicol. El polietilenglicol (PEG) es particularmente preferido. Los radicales de PEG, p. ej., polímeros de 1, 2, 3, 4 o 5 PEG, pueden conjugarse con cada polipéptido Sp35 para aumentar la vida media en suero, en comparación con el polipéptido Sp35 solo. Los radicales de PEG son no antigénicos y esencialmente biológicamente inertes. Los radicales de PEG utilizados en la práctica de la descripción pueden ser ramificados o no ramificados.

- 30 El número de radicales de PEG unidos al polipéptido Sp35 y el peso molecular de las cadenas de PEG individuales pueden variar. En general, a mayor peso molecular del polímero, menos cadenas de polímero ancladas al polipéptido. Preferiblemente, la masa total de polímero unido al polipéptido Sp35 es de 20 kDa a 40 kDa. Por lo tanto, si se ancla una cadena de polímero, el peso molecular preferido de la cadena es de 20-40 kDa. Si se anclan dos cadenas, el peso molecular preferido de cada cadena es de 10-20 kDa. Si se anclan tres cadenas, el peso molecular preferido es de 7-14 kDa.

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

- 40 Preferiblemente, en una reacción de conjugación, se emplean de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 moles de polímero activado por mol de polipéptido, dependiendo de la concentración de polipéptido. Por lo general, la proporción elegida representa un equilibrio entre la maximización de la reacción a la vez que se minimizan las reacciones secundarias (a menudo no específicas) que pueden perjudicar la actividad farmacológica deseada del radical de Sp35. Preferiblemente, se conserva al menos 50% de la actividad biológica (como se demuestra, p. ej., en cualquiera de los análisis descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica) del polipéptido Sp35, y lo más preferiblemente se conserva casi 100%.

- 50 El polímero se puede conjugar al polipéptido Sp35 utilizando la química convencional. Por ejemplo, se puede acoplar un radical de polialquilenglicol a un grupo épsilon-amino de lisina del polipéptido Sp35. La conexión a la cadena lateral de lisina se puede realizar con un éster activo de N-hidroxilsuccinimida (NHS) tal como succinimidil succinato de PEG (SS-PEG) y propionato de succinimidilo (SPA-PEG). Los radicales de polialquilenglicol adecuados incluyen,

p. ej., carboximetil-NHS, norleucina-NHS, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carbonilimidazol y carbonato de PNP. Estos reactivos están disponibles en el mercado. Los conectores de PEG reactivos con amina adicionales pueden ser sustituidos por el radical succinimidilo. Estos incluyen, p. ej., isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos, epóxidos, y carbonatos de benzotriazol. Las condiciones se seleccionan preferiblemente para maximizar la selectividad y el alcance o la reacción. Dicha optimización de las condiciones de reacción se encuentra dentro del conocimiento práctico normal de la técnica.

La PEGilación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Focus on Growth Factors, 3:4-10, 1992; solicitudes de patente Europea publicadas EP 0 154 316 y EP 0 401 384. La PEGilación puede llevarse a cabo utilizando una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo).

La PEGilación por acilación generalmente implica hacer reaccionar un derivado éster activo de polietilenglicol. En la PEGilación se puede emplear cualquier molécula de PEG reactivo. Un éster de PEG activado preferido es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida (NHS). Según se utiliza en la presente memoria, "acilación" incluye, sin limitación, los siguientes tipos de uniones entre la proteína terapéutica y un polímero soluble en agua tal como PEG: amida, carbamato, uretano, y similares. Véase, Bioconjugate Chem. 5: 133-140, 1994. Los parámetros de reacción se deben seleccionar para evitar condiciones de temperatura, disolvente y pH que dañarían o inactivarían el polipéptido Sp35.

Preferiblemente, la unión de conexión es una amida. Preferiblemente, al menos 95% del producto resultante está mono, di- o tri-pegilado. Sin embargo, se pueden formar algunas especies con mayores grados de PEGilación en cantidades que dependen de las condiciones de reacción específicas utilizadas. Opcionalmente, las especies PEGiladas purificadas se separan de la mezcla, particularmente las especies que no han reaccionado, mediante métodos de purificación convencionales, incluyendo, p. ej., diálisis, desplazamiento salino, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, y electroforesis.

La PEGilación por medio de alquilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado aldehído terminal de PEG con Sp35 en presencia de un agente reductor. Además, se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la PEGilación sustancialmente solo en el grupo amino N-terminal de Sp35 (es decir, una proteína mono-pegilada). En cualquier caso de mono-PEGilación o poli-PEGilación, los grupos PEG se unen preferiblemente a la proteína mediante un grupo -CH₂-NH-. Con referencia particular al grupo -CH₂-, este tipo de unión se conoce como unión "alquílica".

La derivatización mediante alquilación reductiva para producir un producto mono-PEGilado explota la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente a extremo N) disponibles para la derivatización. La reacción se realiza a un pH que permita sacar ventaja de las diferencias de pK_a entre los grupos épsilon-amino de los residuos de lisina y el del grupo amino N-terminal de la proteína. Mediante tal derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo N-terminal de la proteína y no se produce la modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de la lisina.

Las moléculas de polímero utilizadas en los enfoques tanto de acilación como de alquilación se seleccionan entre los polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado debe ser modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, preferiblemente, de modo que el grado de polimerización pueda controlarse como se indica en los presentes métodos. Un aldehído de PEG reactivo ilustrativo es polietilenglicol propionaldehído, que es estable en agua, o derivados mono alcoxi o ariloxi C1-C10 del mismo (véase, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el polímero o los polímeros seleccionados deben tener un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductiva, el polímero o los polímeros seleccionados deben tener un único grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero soluble en agua no será seleccionado entre los residuos glicosilo de origen natural ya que estos son elaborados generalmente más convenientemente por sistemas de expresión recombinantes de mamífero.

Los métodos para la preparación de un Sp35 PEGilado generalmente incluyen las etapas de (a) hacer reaccionar una proteína o polipéptido Sp35 con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG) bajo condiciones en las que la molécula se une a uno o más grupos de PEG, y (b) obtener el producto o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación serán determinadas caso por caso basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto poli-PEGilado.

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

Para una población sustancialmente homogénea de mono-polímero/Sp35, las condiciones de reacción de alquilación reductiva son aquellas que permiten la unión selectiva del radical del polímero soluble en agua al extremo N-terminal de Sp35. Tales condiciones de reacción proporcionan generalmente diferencias de pKa entre los grupos amino de la cadena lateral de lisina y el grupo amino N-terminal. Para los propósitos de la presente descripción, el pH preferido está en el intervalo de 3-9, preferiblemente 3-6.

Los polipéptidos Sp35 pueden incluir una etiqueta, p. ej., un radical que puede ser liberado posteriormente por medio de proteólisis. Por lo tanto, el radical de lisina se puede modificar selectivamente haciendo reaccionar primero una etiqueta de His modificada con un conector de bajo peso molecular tal como el reactivo de Traut (Pierce) que reaccionará tanto con la lisina como con el extremo N-terminal, y a continuación liberando la etiqueta de His. El polipéptido contendrá entonces un grupo SH libre que puede modificarse selectivamente con un PEG que contiene un grupo de cabeza reactivo con tiol tal como un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, o un SH libre o protegido.

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

En algunos casos, el radical de polialquilenglicol se acopla a un grupo cisteína del polipéptido Sp35. El acoplamiento puede realizarse utilizando, p. ej., un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, o un grupo tiol.

Opcionalmente, el polipéptido Sp35 se conjuga con el radical de polietilenglicol a través de un enlace lábil. El enlace lábil puede escindirse en, p. ej., hidrólisis bioquímica, proteólisis, o escisión de sulfhidrilo. Por ejemplo, el enlace puede escindirse en condiciones *in vivo* (fisiológicas).

Las reacciones pueden tener lugar por medio de cualquier método adecuado utilizado para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, preferiblemente a un pH de aproximadamente 5-8, p. ej., pH de 5, 6, 7, u 8, si los grupos reactivos se encuentran en el grupo alfa amino en el extremo N-terminal. Generalmente, el procedimiento implica preparar un polímero activado y después de ello hacer reaccionar la proteína con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para la formulación.

Vectores

La presente descripción proporciona vectores que comprenden los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos Sp35. La elección del vector y las secuencias de control de la expresión a las que los ácidos nucleicos de la presente descripción están conectados operativamente dependen de las propiedades funcionales deseadas, p. ej., expresión de la proteína, y de célula anfitriona que se vaya a transformar.

Los elementos de control de la expresión útiles para regular la expresión de una secuencia codificante conectada operativamente son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción y otros elementos reguladores. Cuando se utiliza un promotor inducible, éste puede ser controlado, p. ej., por un cambio en el estado de nutrientes, o un cambio en la temperatura, en el medio de la célula anfitriona.

El vector puede incluir un replicón procariótico, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y mantener la molécula de ADN recombinante extra-cromosómicamente en una célula anfitriona bacteriana. Tales replicones son bien conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un replicón procariótico pueden incluir también un gen cuya expresión confiere un marcador detectable tal como la resistencia a fármacos. Los ejemplos de genes bacterianos de resistencia a fármacos son los que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina.

Los vectores que incluyen un replicón procariótico también pueden incluir un promotor procariótico o de bacteriófago para dirigir la expresión de las secuencias de genes codificantes en una célula anfitriona bacteriana. Las secuencias promotoras compatibles con anfitriones bacterianos son proporcionadas típicamente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN que se vaya a expresar. Los ejemplos de tales vectores plasmídicos son pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 (BioRad), pPL y pKK223 (Pharmacia). Se puede utilizar cualquier anfitrión procariota adecuado para expresar una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína de la descripción.

Los vectores de expresión de células eucariotas son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Típicamente, tales vectores contienen sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Los vectores ilustrativos incluyen pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), el vector de expresión retroviral pMIG, el vector lanzadera de adenovirus pDC315 y vectores AAV.

Los vectores de expresión de células eucariotas pueden incluir un marcador seleccionable, p. ej., un gen de resistencia a fármacos. El gen de la neomicina fosfotransferasa (neo) (Southern et al., 1982, J. Mol. Anal. Genet. 1: 327-341) es un ejemplo de un tal gen.

Para expresar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, los ADN que codifican las cadenas pesada y ligera parciales o completas se insertan en vectores de expresión tales como plásmidos, retrovirus, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV, y similares. El vector de la expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen de manera que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados. En algunos casos, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina C_H o C_L humana funcionalmente completa. Preferiblemente, se diseñan sitios de restricción de manera que se pueda insertar y expresar fácilmente cualquier secuencia V_H o V_L. En tales vectores, el corte y empalme se produce usualmente entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que se producen dentro de los exones C_H humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos aguas abajo de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula anfitriona.

Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células anfitrionas de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores e intensificadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/intensificador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/intensificador de SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina y actina nativos. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véanse p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.168.062 de Stinski; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.510.245 de Bell; y Patente de los Estados Unidos Núm. 4.968.615 de Schaffner.

Los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (véase p. ej., Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017 de Axel). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos Sp35 y anticuerpos anti-Sp35, y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico, se pueden utilizar para la transformación de una célula anfitriona adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método adecuado. Los métodos para la introducción de ADN exógeno en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero por medio de vectores virales.

La transformación de células anfitrionas puede realizarse mediante métodos convencionales adecuados para el vector y la célula anfitriona empleados. Para la transformación de células anfitrionas procariotas, se pueden emplear los métodos de electroporación y de tratamiento con sal (Cohen et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114). Para la transformación de células de vertebrados, se pueden emplear métodos de electroporación, lípidos catiónicos o tratamiento con sal. Véanse, p. ej., Graham et al., 1973, Virology 52: 456-467; Wigler et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1373-1376f.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como anfitriones para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, entre otras, Células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549, y varias otras líneas celulares.

La expresión de polipéptidos a partir de líneas celulares de producción puede aumentarse utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de glutamina sintetasa (GS) se utiliza comúnmente para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. Véanse, p. ej., las Patentes Europeas Núms. 0216846, 0256055, y 0323997 y la Patente Europea Núm. 89303964.4. 0338841.

Células anfitrionas

Las células anfitrionas pueden ser procariotas o eucariotas. Las células anfitrionas eucariotas preferidas incluyen, pero no se limitan a, células de levadura y de mamífero, p. ej., Células de ovario de hámster chino (CHO) (Núm. de Acceso ATCC CCL61), células de embrión de ratón Swiss NIH NIH-3T3 (Núm. de Acceso ATCC CRL1658), y células de riñón de cría de hámster (BHK). Otras células anfitrionas eucariotas útiles incluyen células de insecto y células vegetales. Las células anfitrionas procariotas ilustrativas son *E. coli* y *Streptomyces*.

Formulaciones

Las composiciones que contienen polipéptidos Sp35, anticuerpos anti-Sp35, o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-Sp35 pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados. Por ejemplo, pueden contener excipientes y/o agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos a preparaciones diseñadas para la liberación en el sitio de acción. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, se pueden administrar suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas para inyectables apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyectables pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, p. ej., carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. Los liposomas también se pueden utilizar para encapsular las moléculas de la presente descripción para la liberación en células o espacios intersticiales. Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos son disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares fisiológicamente compatibles. En algunos casos, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. En algunos casos, las composiciones comprenden sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia de los ingredientes activos.

Las composiciones de la descripción pueden estar en una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, líquidas (p. ej., disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones, suspensiones, formas de dosificación semi-sólidas y sólidas. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

La composición se puede formular en forma de una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente filtrada en condiciones estériles. La fluidez apropiada de una disolución puede mantenerse, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

El ingrediente activo puede ser formulado con una formulación o dispositivo de liberación controlada. Los ejemplos de tales formulaciones y dispositivos incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, por ejemplo, etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, polioctoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones y dispositivos son conocidos en la técnica. Véase *por ejemplo*., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las formulaciones de depósito inyectables se pueden elaborar formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la razón de fármaco a polímero, y la naturaleza del polímero empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables ilustrativos son los polioctoésteres y polianhídridos. Las formulaciones inyectables de depósito también se pueden preparar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones.

A las composiciones se pueden incorporar compuestos activos complementarios. En algunos casos, se administra simultáneamente un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35 o un fragmento del mismo con un anticuerpo anti-NgR1, o un fragmentos de unión a antígeno del mismo, o polipéptidos NgR1 solubles o proteína de fusión de NgR1.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es

ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Véase, p. ej., Remington Pharmaceutical Sciences (Mack pub. Co., Easton, PA 1980).

Además del compuesto activo, la forma de dosificación líquida puede contener ingredientes inertes tales como agua, alcohol etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

Terapia génica

Un polipéptido Sp35 puede ser producido *in vivo* en un mamífero, p. ej., un paciente humano, utilizando un enfoque de terapia génica para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o lesión del SNC en los que la reducción de la inhibición de la extensión axonal sería terapéuticamente beneficiosa. Esto implica la administración de un ácido nucleico que codifica un polipéptido Sp35 adecuado conectado operablemente a secuencias de control de la expresión adecuadas. Preferiblemente, estas secuencias se incorporan a un vector viral. Los vectores virales adecuados para dicha terapia génica incluyen vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores baculovirales, vectores virales de Epstein Barr, vectores papovavirales, vectores virales de vaccinia, vectores virales de herpes simplex y vectores de virus adenoasociados (AAV). El vector viral puede ser un vector viral de replicación defectuosa. Un vector adenoviral preferido tiene una delección en su gen E1 o gen E3. Cuando se utiliza un vector adenoviral, preferiblemente el mamífero no está expuesto a un ácido nucleico que codifica un gen marcador seleccionable.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos experimentales. Los ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente, y no deben interpretarse como limitantes del alcance o el contenido de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: Patrón de Expresión de Sp35

La expresión de Sp35 en tejidos humanos se evaluó mediante análisis de transferencia Northern. Se hibridaron transferencias de tejidos múltiples que contenían 12 tejidos principales humanos o 14 tejidos del SNC humano durante la noche a 68°C con una sonda Sp35 marcada con P³² (nucleótidos 150-450 de la secuencia de ADNc de Sp35). Las transferencias se lavaron 3 veces con 2x SSC, SDS al 0,5%, a continuación 3 veces con SSC 0,5x, SDS al 0,1%. A continuación, la transferencia se expuso a una película de rayos X y los niveles de ARNm se visualizaron mediante autorradiografía.

Sp35 fue expresado altamente en el cerebro humano pero no en corazón, músculo esquelético, colon, timo, bazo, riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmón y leucocitos de sangre periférica. Sp35 fue expresado en todos los tejidos del cerebro sometidos a ensayo, incluyendo tejidos aislados de la corteza frontal, corteza posterior, corteza entorrinal, hipocampo, bulbo olfatorio, cuerpo estriado, tálamo, cerebelo, cerebro medio, pons, bulbo raquídeo y médula espinal. Se observó un gradiente de expresión génica a lo largo del eje rostral/cordal para Sp35, con niveles más altos en la corteza cortical y niveles más bajos en la médula espinal.

Se utilizó tinción inmunohistoquímica (IHC) para determinar si Sp35 se expresa en células específicas del cerebro. Se incubaron cerebros de rata, secciones de médula espinal, o cultivos de neuronas granulares primarias fijados en paraformaldehído al 4% con anticuerpos primarios para Sp35, según se indica, seguido de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 480 o 590 (Molecular Probes Inc.). Las secciones se montaron a continuación en Vectashield y se visualizaron por medio de microscopía de fluorescencia. Los anticuerpos específicos anti-Sp35 utilizados para IHC se generaron a partir de una biblioteca de presentación de fagos de Fab usando la tecnología MorPhosys.

Sp35 se expresa específicamente en neuronas y oligodendrocitos, pero no en astrocitos. Esto se determinó en experimentos en los que las secciones de tejido de cerebro de Rata se tiñeron con diversos agentes, incluyendo marcador anti-astrocitos GFAP, un anticuerpo para un marcador de oligodendrocitos (O4), y un anticuerpo para el marcador neuronal tubulina β III, todo contrateñido con un anticuerpo anti-Sp35. Los oligodendrocitos y las neuronas se tiñeron intensamente con el anticuerpo anti-Sp35. No se observó tinción de los astrocitos.

Como una confirmación independiente del patrón de expresión de Sp35, los autores de la presente invención realizaron una RT-PCR semicuantitativa utilizando ARNm extraído (kit Ambion) de cultivos celulares primarios de rata de astrocitos, oligodendrocitos y neuronas granulares del cerebelo purificados. Se utilizaron el cebador directo AAGGCCAGCAGGTGTTGTGGA (SEQ ID NO: 14) y el cebador inverso TACTCGATCTCGATGTTGTGCTTT (SEQ ID NO: 15). Después de 26 ciclos, se observó una banda fuerte en el ARNm de las neuronas, se detectó una señal distinta pero más débil en el ARNm de los oligodendrocitos, y no se observó ninguna banda en los astrocitos.

Ejemplo 2: Proteína de fusión de Sp35-Fc

Para estudiar la función biológica de Sp35, se elaboró un constructo fusionando la porción extracelular de Sp35 humano (residuo 1-531) a la bisagra y la región Fc de IgG1 humana. Se obtuvo una secuencia codificante parcial de Sp35 humano mediante PCR a partir del clon 227,2 (Incyte) utilizando el cebador directo 5'CAGCAGGTCGACGCGGCCGCGATGCTGGCGGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 16) y el cebador inverso 5'CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGGTTGG3' (SEQ ID NO: 17).

El producto de PCR de extremo romo se subclonó en el sitio SrfI del vector PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para crear PCR SCRIPT AMP-sp35. Un fragmento Sall se aisló de PCR SCRIPT AMP-sp35 y se subclonó en el vector PCRCAMP Ig (derivado del vector PCR SCRIPT AMP de Stratagene en donde la secuencia de Fc gamma se subclonó como un fragmento Sall(5') a NotI(3')), fusionando la secuencia señal de Sp35 y la secuencia de ectodominio (codones 1 a 531) en marco con secuencias que codificaban la bisagra y la región Fc de Ig1 humana. Se identificaron los productos aislados correctos, y un fragmento NotI que abarcaba el fragmento Sp35-Fc se subclonó en el único sitio de clonación Not I del vector de expresión de 293E, CH274, un derivado del vector de expresión REP4 comercial (Invitrogen). La fusión Sp35-Fc codificada por el nuevo vector, CH274/sp35-Fc, se confirmó por medio de secuenciación de ADN como un plásmido GT123.

Se generaron líneas celulares estables que expresaban la proteína de fusión Sp35-Fc mediante electroporación de células anfitrionas CHO DG44 con el plásmido GT123. Las células CHO transfectadas se cultivaron en MEM alfa menos en presencia de suero dializado al 10% y glutamina 4 mM para seleccionar el crecimiento independiente de nucleósidos. Catorce días después de la transfección, las células se alimentaron con medio de nueva aportación. Para escrutar las células que expresaban Sp35-Fc, las células CHO se marcaron con anti-IgG humana de cabra marcada con Ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) y se sometieron a clasificación mediante citometría de flujo de alta velocidad en un FACS Mo-Flo (Cytomation). Se seleccionaron las células que expresaban los niveles más altos de Sp35-Ig. Estas células se expandieron en cultivo durante 7 días, a continuación se volvieron a marcar y a clasificar. Las células que expresaban los niveles más altos de Sp35-Ig se aislaron como clones individuales en placas de 96 pocillos. Estos clones se desarrollaron durante dos semanas y a continuación se alimentaron con medio de nueva aportación un día antes del análisis FACS para comprobar los niveles de expresión. Los clones que expresaban los más altos niveles de Sp35-Fc se expandieron y se establecieron bancos de células congeladas. Las líneas celulares se adaptaron al crecimiento en cultivo en suspensión en el medio BCM16 carente de suero. El título de Sp35-Fc producida por estos clones se determinó desarrollando líneas celulares a 37°C durante 4-5 pases, a continuación, desarrollando las células a una la densidad celular máxima de 50% y cultivándolas durante 10-15 días a 28°C hasta que la densidad celular viable se redujo a 75%. En este momento, se recogieron los medios de cultivo, se aclararon de células y desechos por centrifugación, y se titularon los sobrenadantes de cultivo para determinar los niveles de Sp35-Fc por medio de análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-Ig humana (Jackson Lab) como sonda.

La proteína de fusión de Sp35-Fc se purificó a partir del medio de cultivo aclarado como sigue: se añadieron 9 mL de HEPES 1 M de pH 7,5 a 900 mL de medio condicionado. El medio se cargó por lotes durante 3 horas a 4°C en 3 mL de Proteína A Sefarosa (Pharmacia). La resina se recogió en una columna de 1,5 cm (DI), y se lavó cuatro veces con 3 mL de PBS, dos veces con 4 mL de PBS que contenía NaCl 800 mM y, a continuación, de nuevo con 3 mL de PBS. El Sp35-Fc se eluyó de la columna con NaH₂PO₄ 25 mM de pH 2,8, NaCl 100 mM en fracciones de 1,5 mL y se neutralizó mediante la adición de 75 µl de NaH₂PO₄ 0,5 M de pH 8,6. Las fracciones que contenían proteína de los picos se identificaron mediante absorbancia a 280 nm, se agruparon, y se sometieron a purificación adicional en una columna de Proteína A de 1 mL. Antes de la carga, se añadió NaCl a una concentración 600 mM y HEPES de pH 7,5 a una concentración 50 mM. La columna se lavó dos veces con 600 µl de HEPES 10 mM de pH 7,5, NaCl 1 M, y a continuación con 1 mL de PBS. La Sp35-Fc se eluyó de la columna con NaH₂PO₄ 25 mM de pH 2,8, NaCl 100 mM, recogiendo fracciones de 0,5 mL, y se neutralizó mediante la adición de 25 µl de NaH₂PO₄ 0,5 M de pH 8,6. Las fracciones que contenían proteína de los picos se identificaron mediante absorbancia a 280 nm y se agruparon. Mediante SDS-PAGE reductora, la Sp35-Ig migró como una única banda (> 95% de pureza) con una masa aparente de 90 kDa. Bajo condiciones no reductoras, la proteína corrió como un dímero con una masa aproximada de 180 kDa. La Sp35-Fc purificada se dividió en alícuotas y se almacenó a -70°C. El fragmento NotI de GT123, que contenía los aminoácidos 1-531 de Sp35 y Fc de IgG1 humana, se subclonó en el sitio NotI del vector PV90 para crear DB002.

Ejemplo 3: Proteína de Fusión His-AP-Sp35

Para estudiar y aislar el receptor de Sp35, la proteína se expresó en células COS7 y CHO como una proteína de fusión de fosfatasa alcalina etiquetada con His (His-AP). El plásmido se construyó como sigue: El dominio extracelular de Sp35 (aa 34-532) se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores (directo) 5'-AATTAAGAATTACGGGCTGCCGCGCCCGCTGCGAGT-3' (SEQ ID NO: 18), que contenía un sitio de escisión Eco RI (subrayado), e (inverso) 5'-TATATTTCTAGATCACTCGCCCGGCTGGTTGGAGATGAAAGCGA-3' (SEQ ID NO: 19), que contenía un sitio de escisión Xba I (subrayado). El producto de PCR se escindió con Xba I, el extremo adherente resultante se rellenó con ADN polimerasa de T4, después se digirió con Eco RI y se purificó en gel. El producto digerido se ligó en un fragmento His-AP relleno con Hind III/EcoRI a partir del vector His-AP-pcDNA 1.1 (Invitrogen). El fragmento His-AP-Sp35 se digirió con Hind III y Eco RI, se rellenó, a continuación se ligó en el sitio relleno con Not I en el vector pV90. La secuencia de ADN del inserto se confirmó mediante secuenciación de

ADN.

Las células COS7 se dividieron el día antes de la transfección. El vector de ADN His-AP-Sp35 (8 µg) se utilizó para transfectar 5×10^6 células utilizando lipofectamina (Invitrogen). El medio acondicionado se cosechó 48 h después de la transfección.

- 5 Los autores de la presente invención desarrollaron una línea celular CHO que expresaba la proteína de fusión His-AP-Sp35 utilizando el plásmido pV90. Las células anfitrionas CHO DG44 (2×10^6 células) se transfectaron con 100 µg de plásmido por electroporación. Las células se cultivaron en alfa-MEM menos en presencia de suero dializado al 10% y glutamina 4 mM para seleccionar el crecimiento independiente de nucleósidos. Catorce días después de la transfección las células fueron alimentadas con medio de nueva aportación antes del escrutinio mediante clasificación FACS Mo-Flo (Cytomation). Las células CHO transfectadas se marcaron con el anticuerpo monoclonal de ratón 8B6 dirigido a fosfatasa alcalina de placenta humana (Sigma). Se utilizó un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón de cabra marcado con PE para producir una señal específica para las células transfectadas. Después del marcaje con PE, las células se sometieron a clasificación mediante citometría de flujo de alta velocidad y se seleccionó el primer 5%.
- 10 Para producir medio acondicionado con His-AP-Sp35, se seleccionaron las células que expresaban los niveles más altos de His-AP-Sp35. Las líneas celulares se adaptaron para crecer en cultivo en suspensión en medio libre de suero (BCM16). El título de His-AP-Sp35 que fue producido por estos clones se determinó mediante líneas celulares que crecían a 37°C durante 4-5 pases, desarrollando a continuación las células a 50% de la densidad celular máxima y cultivándolas durante 10-15 días a 28°C hasta que la densidad de células viables bajó a 75%. Los medios de cultivo se recogieron, se aclararon de células y desechos mediante centrifugación, y los sobrenadantes de cultivo se titularon para determinar los niveles de His-AP-Sp35 mediante análisis de transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-AP humano (Jackson Labs) como sonda.
- 15
- 20

- His-AP-Sp35 se purificó a partir del medio acondicionado de la siguiente manera: 400 mL de medio condicionado de células CHO que expresaban His-AP-Sp35 se diluyeron con 400 mL de agua. Se añadió trietanolamina de pH 8,5 a una concentración 25 mM a partir de una provisión de partida 0,5 M y la muestra se cargó por lotes durante 2 horas a 4°C en 6 mL de resina de intercambio aniónico Fractogel TMAE (EM Industries). La resina se recogió en una columna de 1,5 cm (DI), y se lavó dos veces con 6 mL de HEPES 10 mM de pH 7,5, NaCl 50 mM. El AP-Sp35 se eluyó de la columna con HEPES 10 mM de pH 7,5, NaCl 200 mM en fracciones de 2 mL. Las fracciones de los picos se identificaron mediante la supervisión de la actividad AP y mediante SDS-PAGE. La fracción de flujo directo de la columna de TMAE se diluyó adicionalmente con 300 mL de agua y se cargó por lotes durante la noche a 4°C en 6 mL de resina TMAE. La resina se recogió y se lavó como se ha descrito anteriormente y se eluyó con HEPES 10 mM de pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones de los picos se identificaron de nuevo mediante el control de la actividad AP y mediante SDS-PAGE. His-AP-Sp35 de la primera columna tenía una pureza de 50% y AP-Sp35 de la segunda columna tenía una pureza de 90%. En condiciones reductoras, His-AP-Sp35 migró en geles de SDS-PAGE con una masa aparente de 130 kDa. Si bien el material con una pureza de 90% era apropiado para la mayoría de las investigaciones, para algunos estudios His-AP-Sp35 se purificó adicionalmente sobre resina Ni-NTA Agarosa (Qiagen). Se añadió NaCl a las fracciones de elución de la columna TMAE a una concentración 800 mM y trietanolamina 0,5 M de pH 8,5 y se añadió imidazol 1 M de pH 7,0 a una concentración 25 mM y 15 mM, respectivamente. Se cargaron 4,5 mL de la muestra en una columna NiNTA de 400 µL. La columna se lavó tres veces con trietanolamina 25 mM de pH 8,5, NaCl 800 mM, imidazol 15 mM, y e His-AP-Sp35 se eluyó de la columna con imidazol 200 mM de pH 7,0, NaCl 350 mM, recogiendo fracciones de 200 µL. Las fracciones que contenían los picos de AP se reunieron y se sometieron a diálisis durante la noche contra 250 volúmenes de HEPES 10 mM de pH 7,5, NaCl 200 mM. Se añadieron $MgCl_2$ y $ZnCl_2$ para la retención a concentraciones 2 y 0,25 mM, respectivamente. El producto final tenía una pureza mayor de 95% mediante SDS-PAGE, y corrió como una única banda con una masa de aproximadamente 140 kDa en condiciones reductoras.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

- Las construcciones de Sp35 también fueron diseñadas como fusiones de Fc. Se generó un constructo Sp-35 LRR-Fc mediante PCR utilizando los cebadores (directo) 5'CTTGACACG GGATCCGCGGCCGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO: 20) e (inverso) 5'GACGCGGGCGGGCAGCCCGTGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCC3' (SEQ ID NO: 21). El producto de PCR se insertó en el sitio NotI del vector PV90. El constructo de Sp35 IG-Fc se generó mediante PCR usando los cebadores (directo) 5'CTTGACACGCGGATCCGCGGCCGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO: 22) e (inverso) 5'GTCCCGGATGCGGGCGCGGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCCAG3' (SEQ ID NO: 23). El producto de PCR se insertó en el sitio NotI del vector PV90. Las proteínas se expresaron en células CHO y se purificaron utilizando una columna de proteína A sefarosa.
- 50

55 Ejemplo 4: Unión de Sp35 a células que expresan NgR1

Se utilizaron cuatro métodos diferentes para mostrar la unión de Sp35 a NgR1. En primer lugar se detectó la interacción en un análisis de unión directa en donde el producto conjugado de fosfatasa alcalina-Sp35 (AP-Sp35) se incubó con las células que expresaban NgR1 y la unión se evaluó utilizando un reactivo de detección de AP cromogénico. Se hicieron crecer células COS7 confluentes en 90% en placas de cultivo de tejidos de 100 mm y se

transfectaron con plásmidos que expresaban NgR1 utilizando reactivos Eugene 6 (Roche). Después de 48 horas, las células transfectadas se lavaron una vez con HBH (tampón salino equilibrado de Hank, BSA de 1 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,0), y a continuación se incubaron durante 1,5 horas a 23°C con 4 µg/ml de la proteína de fusión de AP-Sp35 en HBH. Las células se lavaron con tampón HBH enfriado con hielo 3 veces durante 3 min cada vez, después se fijaron con formaldehído al 3,7% en HEPES 20 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM durante 15 min, y se transfirieron de nuevo a tampón HBH. La AP termolábil endógena se inactivó con calor durante 2 horas a 67°C. El AP-Sp35 unido se detectó mediante incubación con nitroazul de tetrazolio NBT (Roche). El Ap-Sp35 se unió a las células COS7 que expresaban el receptor NgR1 humano, pero no a las células COS7 de control transfectadas con el vector solo. Se observó un patrón de tinción punteado para NgR1, lo que refleja que solo una fracción, probablemente 50% de las células, se transfectaron con el NgR1.

Para cuantificar mejor la unión, los autores de la presente invención realizaron el mismo experimento, pero las muestras de células paralelas se trataron con 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,125, 0,06 µg/ml de AP-Sp35. La AP unida se incubó con fosfato de 4-nitrofenilo y la actividad AP se evaluó en un lector de placas de 96 pocillos (Molecular Devices). A partir de estos datos, los autores de la presente invención estimaron que la CE50 para la unión de AP-Sp35 a NgR1 humano fue de aproximadamente 6 nM.

En segundo lugar, los autores de la presente invención detectaron la unión de Sp35 a NgR1 en un enfoque ELISA. Las placas de ELISA (Costar) se recubrieron con receptores NgR1-Fc solubles de 10 µg/ml (sNgR310-Fc que contenían péptido 35-310 NgR1 de rata fusionado a la bisagra y Fc de IgG1 de rata y sNgR344-Fc que contenía péptido 35-344 NgR1 de rata fusionado a IgG1 de rata) en NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,0 durante 1 hora a 37°C. Las placas se bloquearon y se lavaron con Hepes 25 mM, pH 7,0, BSA al 0,1%, ovoalbúmina al 0,1%, leche en polvo sin grasa al 0,1% y NaN₃ al 0,001%. Se añadió a la placa proteína AP-Sp35, 4 µg/ml, y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron a continuación con Tris 10 mM de pH 7,5, NaCl 150 mM y la AP unida se detectó utilizando 10 µg/ml de sustrato cromogénico fosfato de 4-nitrofenilo diluido en glicina 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM de pH 10,5. La DO₄₁₀ se determinó en un lector de ELISA (Molecular Devices) equipado con el programa Softmax. AP-Sp35 se unió a la proteína sNgR-344-Fc inmovilizada pero no a sNgR-310-Fc, indicando que se requería la versión más larga de NgR1 para la unión de Sp35. Los autores de la presente invención han sido capaces de hacer competir la unión de AP-Sp35 a NgR1 sNgR344-Fc en 80% pre-incubando AP Sp35 con un exceso de 100 veces de sNgR344-Fc. No se observó competición de la unión utilizando una proteína de fusión Ig1 de erizo-rata como proteína de control de fusión de Ig de rata.

En tercer lugar, los autores de la presente invención detectaron la unión de Sp35 a NgR1 por medio de la inmunoprecipitación simultánea de Sp35 con NgR1. Para este estudio, células COS7 confluentes en 80%, desarrolladas en placas de cultivo de tejidos de 100 mm, se transfectaron con plásmidos que codificaban Sp35-hemaglutinina (Sp35-HA) y NgR-FLAG utilizando reactivos Eugene 6 (Roche) 48 horas después de la transfección, las células se cosecharon y se lisaron en 1 mL de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% y glicerol al 10%) a 4°C durante 30 min. El producto lisado se centrifugó a continuación a 14.000 xg durante 15 min, y se recogieron los sobrenadantes y se incubaron a 4°C durante la noche con agitación, usando una matriz de afinidad anti-HA (Roche). Las muestras se lavaron 3 veces con 1 mL de tampón de lisis, a continuación se hirieron durante 3 minutos en tampón de muestra de Laemmli, se sometieron a SDS-PAGE al 4-15%, y se analizaron mediante inmunotransferencia con el anticuerpo Anti-FLAG M2 (Sigma). La resina de afinidad anti-etiqueta de HA recogió un complejo que contenía tanto Sp35-HA como FLAG-NgR, como resulta evidente por la presencia de FLAG. Este complejo no se observó en productos lisados de transfecciones de control en las que las células fueron tratadas con el plásmido Sp35-HA o plásmido FLAG-NgR1 solo, o células que fueron transfectadas simultáneamente con Flag-NgR1 y una proteína de control etiquetada con HA que no se une a NgR1.

Sp35-HA se preparó como sigue. La secuencia señal y el dominio extracelular de Sp35 (aminoácidos 1-531) se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores 5'ATATTCTAGAATGCTGGCGGGGGCGTGAG3' (SEQ ID NO: 24) y 5'ATATACTAGTGTCTGTCGTTGCCGCCCGCGTTGG3' (SEQ ID NO: 25) que contenían sitios XbaI y SpeI (subrayados). El producto de PCR fue digerido mediante XbaI y SpeI y se insertó en el vector pCGCHA entre los sitios Xba I y Spe I. La secuencia del inserto se confirmó mediante secuenciación de ADN. El constructo FLAG NgR1 fue una donación del Dr. Zhigang He (Nature, Vol. 420, 7 de Noviembre de 2002).

En cuarto lugar, los autores de la presente invención demostraron que Ap-Sp35 se unía a neuronas granulares de cerebelo de rata (CGN) que expresaban NgR1. Para este experimento, se hicieron crecer células CGN del día 8 después del nacimiento confluentes en 90% en placas de cultivo de tejidos de 100 mm. Después de 48 horas, las células se lavaron una vez con tampón HBH, y a continuación se incubaron con 4 µg/ml de AP-Sp35 en tampón HBH durante 1,5 horas a 23°C. Las células se lavaron después con HBH enfriado en hielo 3 veces durante 3 minutos cada vez, después se fijaron con formaldehído al 3,7% en HEPES 20 mM, pH 7,0, y NaCl 150 mM durante 15 min, y se transfirieron de nuevo a HBH. La AP termolábil endógena fue inactivada con calor durante 2 horas a 67°C. El AP-Sp35 unido se detectó mediante incubación con nitroazul de tetrazolio NBT (Roche). El AP-Sp35 se unió a neuronas granulares de cerebelo del día 8 después del nacimiento, que expresaban NgR1. La unión de AP-Sp35 a las neuronas fue inhibida mediante el tratamiento de la CGN con PIPLC (5 unidades/ml) que escinde la mayoría de las proteínas ancladas a GPI de las superficies de las membranas. Puesto que NgR1 es una proteína unida a GPI, este resultado apoya la idea de que Sp35 se está uniendo a NgR1 en células CGN.

Ejemplo 5: Co-localización de Sp35 con NgR1

Para determinar si Sp35 y NgR1 se expresan en las mismas neuronas, los autores de la presente invención realizaron un estudio de co-localización. Cultivos de neuronas granulares primarias p8 de rata fijadas con paraformaldehído al 4% se incubaron con anticuerpos contra Sp35 y NgR1 (Santa Cruz), y a continuación con los anticuerpos secundarios marcados con Alexa apropiados (Molecular Probes Inc.). Las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal. Las neuronas fueron teñidas intensamente por los anticuerpos para Sp35 y NgR1. Ambas proteínas se expresaron en los cuerpos celulares y los axones de las neuronas. Para ayudar en el análisis de co-localización, se utilizaron diferentes sondas coloreadas para los 2 tipos de anticuerpos. Cuando se combinaron las tinciones (color rojo para las células positivas para NgR y color verde para las células positivas para Sp35) los autores de la presente invención observaron un color amarillo en toda la célula que indicaba que las dos proteínas se co-localizaban dentro de las neuronas.

Ejemplo 6: Sitios de Unión a NgR1 dentro de Sp35

Los autores de la presente invención utilizaron mapeo de delección para definir los dominios específicos de Sp35 implicados en las interacciones con NgR1. Los siguientes constructos de delección se realizaron utilizando el kit Stratagene Quikchange Mutagenesis. Los autores de la presente invención verificaron todos los constructos de vectores mediante secuenciación del ADN de los insertos modificados.

His-AP-Sp35b que contenía el dominio de repeticiones ricas en leucina de Sp35 más la región alcalina (aa 34-432) se clonó a partir del vector His-AP-Sp35 (aa 34-532) mediante PCR. Los cebadores utilizados fueron 5'-CCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGTGATCTAGGGCCGCGGATCCCTG-3' (SEQ ID NO: 26) y 5'-CAGGGATCCGCGGCCCTAGATCACTCGTCCACAAACACCTGCTGGG-3' (SEQ ID NO: 27).

His-AP-Sp35d, que codificaba el dominio Ig de Sp35 más la región alcalina (aa 417-531), se clonó a partir del vector His-AP-Sp35a (aa 37-531) mediante PCR. Los cebadores utilizados fueron 5'-CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCCGCGCCCGCATCCGGGACCGC-3' (SEQ ID NO: 28) y 5'-GCGGTCCCGGATGCGGGCGCGGAATTCACCCGGGTGCGCGGCG-3' (SEQ ID NO: 29).

His-AP-Sp35e, que codificaba solo el dominio Ig (aa 425-531), se clonó a partir del vector His-AP-Sp35 (aa 34-532) mediante PCR. Los cebadores usados fueron 5'-CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCCGCGCCAGCAGGTGTTTGTGGAC-3' (SEQ ID NO: 30) y 5'-GTCCACAAACACCTGCTGGGCGAATTCACCCGGGTGCGCGGCG-3' (SEQ ID NO: 31).

Se utilizaron un kit y un protocolo de mutagénesis comerciales (Stratagene Quikchange) para mutar el aminoácido 456 (de arginina a ácido glutámico) y el aminoácido 458 (de histidina a la valina) de Sp35 en el vector His-AP-Sp35 (34-532). Los cebadores utilizados fueron 5'-CATCCTCTGGCTCTCACCCGAAAAGGTACTGGTCTCAGCCAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 32) y 5'-GCTCTTGGCTGAGACCAGTACCTTTTCGGGTGAGAGCCAGAGGATG-3' (SEQ ID NO: 33).

Se diseñaron constructos de delección His-AP-Sp35 (Fig. 3) en vectores de expresión pV90 y se expresaron en células 293. El medio acondicionado se recogió y los aductos de AP se purificaron mediante etapas de cromatografía secuencial en resina Fractogel TMAE y agarosa NiNTA. Las proteínas purificadas se sometieron a ensayo para determinar la unión a NgR1 expresado en células COS7. Los tres constructos se unieron débilmente a Sp35. Estos resultados indicaron que el dominio de 1-14 repeticiones LRR de Sp35 (aminoácido 34 a 417) y el dominio Ig de Sp35 (aminoácidos 425-531) contribuyen ambos a la unión de Sp35 a NgR1. El dominio Ig mostró mayor afinidad que el dominio LRR.

Se generó un modelo estructural para el dominio Ig de Sp35 utilizando la estructura cristalina NCAM como marco (Rasmussen et al., 2000, Nat. Struct. Biol. 7: 389-393). A partir de este modelo, los autores de la presente invención observaron un bucle (números de residuos 454 a 458, aminoácidos: SPRKH; SEQ ID NO: 34) que podrían estar implicados en la unión. Para probar esta hipótesis, los autores de la presente invención diseñaron un constructo de Sp35 en donde los residuos R en 456 y H en 458 se cambiaron a E y V, respectivamente. Cuando este constructo se sometió a ensayo para determinar la unión a NgR1, los autores de la presente invención observaron una caída de >10 veces en la señal. Como un enfoque alternativo para someter a ensayo la contribución de esta región de bucle a la unión, los autores de la presente invención sintetizaron un péptido correspondiente a la secuencia LSPRKH (SEQ ID NO: 10) que los autores de la presente invención ciclaron mediante la adición de cisteínas al extremo N y C del péptido. Tras la unión a NgR1, este péptido bloquea, inhibe o interfiere en la función de NgR1.

Ejemplo 7: Sp35 induce la fasciculación de CGN p8

Para determinar la función biológica de Sp35 en las neuronas, los autores de la presente invención incubaron Sp35-Fc con neuronas granulares del día 8 después del nacimiento para observar si Sp35 puede regular la proyección de neuritas. Portaobjetos de cultivo Labtek (8 pocillos) se recubrieron con poli-D-lisina de 0,1 mg/ml (Sigma) antes de la detección de la proteína Sp35-Fc (16 µg/pocillo de proteína). Los portaobjetos se secaron durante la noche, a continuación se enjuagaron y se recubrieron con laminina de 10 µg/ml (Gibco). Las neuronas granulares de cerebelo

del día 8 después del nacimiento se disociaron y se sembraron en los portaobjetos recubiertos previamente. Los cultivos de los portaobjetos se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 24 horas. Los portaobjetos se fijaron en paraformaldehído al 4% que contenía sacarosa al 20% y se tiñeron con anti-tubulina βIII (Covance TUJ1). Después de 24 horas, las CGN mostraron clara morfología de fasciculación como resulta evidente por la agrupación de las neuronas. La fasciculación no se observó en las células no tratadas o los controles de muestra recubiertos con proteína Fc.

Ejemplo 8: Efectos de Sp35 sobre la activación/inactivación de RhoA:

Sp35-Fc indujo que las neuronas granulares posnatales del cerebelo experimentaran fasciculación. Debido a que se sabe que la molécula de señalización RhoA está implicada en la fasciculación, los autores de la presente invención determinaron si Sp35-Fc podría regular las funciones de RhoA en las neuronas. Los autores de la presente invención realizaron el experimento de la activación de RhoA como sigue: se transfectaron células 293 o células COS7 con vectores de expresión que contenían combinaciones de RhoA, Sp35 o NgR1 utilizando reactivos Eugene 6 (Roche). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero durante la noche, después se lisaron en Tris 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, NaCl 500 mM, MgCl₂ 10 mM, más un cóctel inhibidor de proteasa. Los productos lisados celulares se aclararon mediante centrifugación a 13.000xg a 4°C durante 5 minutos, y 95% de los sobrenadantes se incubaron con 20 µg de una matriz de afinidad del dominio de unión GST-Rho inmovilizado (cuentas Rhotekin, Upstate Biotechnology) a 4°C durante 45 minutos. Las cuentas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, con inhibidores de proteasa). Se eluyó Rho unida a GTP de las cuentas calentando a 95°C durante 5 min en tampón de muestra de SDS-PAGE. Las proteínas Rho unidas y totales se detectaron mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal contra RhoA (Santa Cruz). Las células COS7 y HEK293 transfectadas con Sp35 indujeron la activación de RhoA, como resulta evidente por un aumento en la cantidad de RhoA-GTP detectada en la transferencia después de la transfección con el gen de Sp35. Se observó una mejora adicional en RhoA-GTP tras el tratamiento con Sp35-Fc. En contraste con el aumento de RhoA-GTP después de la transfección con Sp35 solo, cuando las células fueron transfectadas con Sp35 y NgR1, RhoA resultaba parcialmente inactivada. El tratamiento de estas células con Sp35-Fc dio como resultado una inactivación adicional de RhoA.

Los autores de la presente invención confirmaron una respuesta de señalización por Sp35 usando un análisis FLIPR (Molecular Devices) para determinar los efectos del tratamiento con Sp35 sobre el flujo de Ca⁺⁺. Los autores de la presente invención observaron un flujo de Ca⁺⁺ significativo en células que expresaban Sp35 con el tratamiento de Sp35-Fc, pero no en las células de control tratadas con Sp35-Fc. El flujo de Ca⁺⁺ se redujo cuando las células que habían sido co-transfectadas con NgR1 y Sp35 se trataron con la proteína de fusión Sp35-Fc.

Ejemplo 9: Interacción de la Proteína Sp35 consigo misma

Debido a que los dominios LRR con frecuencia están implicados en interacciones homotípicas, y los autores de la presente invención observaron que la adición de Sp35 soluble a células transfectadas con Sp35 causaba un aumento de RhoA-GTP sobre el que se observó con transfecciones de Sp35 sola, los autores de la presente invención sometieron a ensayo la unión de Sp35 consigo misma. Para realizar este ensayo, los autores de la presente invención utilizaron co-inmunoprecipitación. Se transfectaron células COS7 confluentes en 80%, cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 100 mm, con plásmidos Sp35 HA o Sp35-FLAG, o ambos, utilizando reactivos Eugene 6 (Roche). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se cosecharon y se lisaron en tampón de lisis de 1 mL (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% y glicerol al 10%) a 4°C durante 30 min. El producto lisado se centrifugó a continuación a 14.000xg durante 15 min, y los sobrenadantes se recogieron y se incubaron a 4°C durante la noche agitando, con una matriz de afinidad anti-HA (Roche). Las muestras se lavaron a continuación 3 veces con 1 mL de tampón de lisis, se hirvieron en tampón de muestra de Laemmli, se sometieron a SDS-PAGE al 4-15%, y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-FLAG. La resina de anticuerpo anti-HA capturó un complejo que contenía Sp35-FLAG, según se determinó mediante transferencia Western. Esto indica una interacción directa de Sp35 consigo misma. Los autores de la presente invención también trataron células transfectadas con HA-Sp35 con Sp35-Fc y utilizaron un enfoque de inmunoprecipitación similar para demostrar que HA-Sp35 se unía a Sp35-Fc.

Sp35-FLAG se preparó como sigue. El dominio extracelular del gen Sp35 (aa 1-531) se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 5'AATTAAGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 35) y 5'AATTAAGCGGCCGCTTTGTCATGT3' (SEQ ID NO: 36) que contenían sitios NotI (subrayado). El producto de PCR se digirió mediante NotI y se insertó en el sitio NotI del vector pV90. La secuencia de ADN del inserto se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo 10: Trasplante *in Vivo* de células transformadas con Sp35

Para determinar la función biológica de Sp35 en ratas con la médula espinal lesionada, los autores de la presente invención infectaron células corticales primarias cultivadas (cultivos mixtos) con retrovirus que expresaban Sp35 completa o un control de retrovirus, para la liberación en el epicentro lesionado de médulas espinales de rata. Se

introdujeron 2×10^6 células, y las ratas se sacrificaron el día 10. Las médulas espinales se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche, a continuación se deshidrataron en EtOH del 70%, seguido de 95%. Las muestras de tejido de incluyeron en parafina. Se utilizaron secciones (10 micras de espesor) para la tinción inmunohistoquímica. Las ratas que recibieron las células que expresaban Sp35, en comparación con el control, mostraron menos retracción del axón y más tinción de tubulina β III cerca del epicentro. Se observó un aumento de la supervivencia neuronal en las ratas lesionadas que recibieron Sp35.

El constructo de retrovirus Sp35 se preparó como sigue: El gen Sp35 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37), que contenía un sitio XhoI (subrayado), y 5'-CGCGGGAATTCATATCATCTTCATGTTGAAGT-3' (SEQ ID NO: 38), que contenía un sitio EcoRI (subrayado). El producto de PCR se digirió con XhoI y EcoRI, después se ligó en el vector de retrovirus pMIG (que contenía IRES-GFP), que se había escindido previamente con XhoI y EcoRI. El nuevo vector fue denominado pMMC078. Todos los productos aislados de pMMC078 contenían mutaciones puntuales inadvertidas, por lo que dos productos aislados de pMMC078 se ligaron entre sí. pMMC078.6 se cortó con XhoI y AclI y pMMC078.7 se cortó con XhoI y AclI. Estos dos fragmentos se ligaron entre sí para preparar el plásmido correcto final, pMMC089. La secuencia de ADN del inserto se confirmó mediante secuenciación de ADN. El retrovirus con Sp35 se realizó como se ha descrito. Las células 293G se dividieron el día antes de la transfección. Se utilizaron 8 μ g de ADN de retrovirus con Sp35 para transfectar 5×10^6 células con lipofectamina (Invitrogen). El medio acondicionado se recogió al cabo de 92 horas después de la transfección. El medio acondicionado se centrifugó a 5000g durante 10 minutos, y el sobrenadante se utilizó como una provisión de partida de retrovirus con Sp35. Esta provisión de partida se almacenó a 4°C durante 1 semana o -80°C durante 6 meses.

Ejemplo 11: Modelo Animal de Lesión en la Medula Espinal

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizan utilizando una técnica aséptica. Los animales se manejan durante 1 semana antes de cualquier manipulación quirúrgica. Se administra profilácticamente 100 mg/kg SC de ampicilina antes y después de la cirugía para reducir la incidencia de lesiones por infección de la vejiga.

Los animales se anestesian utilizando Midazolam a 2,5 mg/kg IP junto con isoflurano al 2-3% en O₂ hasta anestesia profunda, medida mediante pellizco en el dedo del pie. Los animales se mantienen en una almohadilla térmica con agua circulante durante la duración de la cirugía y la recuperación. Se utilizan lubricantes oculares para prevenir el secado de la córnea y se suministran 0,05 mg/kg SC de atropina para reducir el exceso de salivación. Se hace una pequeña incisión en la piel y el músculo se retrae para exponer las vértebras. Se realiza una laminectomía dorsal a nivel espinal L6 (y L7 y si es necesaria la colocación de un catéter intratecal, véase a continuación), L6/L7 y las apófisis espinosas adyacentes se fijan rígidamente en un armazón espinal (David Kopf Instruments). Se realiza una hemisección dorsal en L6 con tijeras de iridectomía finas interrumpiendo completamente los componentes del conducto coticospinal (CST) dorsomedial principal y dorsolateral minoritario. Después de la cirugía, el sitio de la laminectomía se cubre con un material protector tal como Durafilm, y el músculo suprayacente se sutura con catgut crómico 4.0 para proteger la columna vertebral expuesta. La piel se sutura y se limpia con una disolución de betadine.

La recuperación funcional de los animales IS se evalúa mediante el método de puntuación de Basso Beattie y Bresnehan (BBB) comúnmente utilizado para evaluar las ratas después de la lesión de la médula espinal. Este método cuantifica la función de la extremidad trasera de ratas mediante el análisis detallado del movimiento de la articulación y la capacidad de carga de peso. Las ratas se evalúan el día después de la lesión de la médula espinal y a continuación semanalmente después de eso.

Inmediatamente después de la transección del CST, se inyectan adenovirus que expresan Sp35 o GFP o virus de control (10^{10} partículas) en el sitio de la transección y las regiones inmediatamente caudal y rostral con respecto al sitio de la lesión. Se inyectan un total de 10 μ l de Adv en 5 sitios diferentes (4 μ l/sitio). Para la administración intratecal de la proteína Sp35, se realiza un pequeño orificio en la duramadre de la médula espinal 2 mm caudal con respecto a la lesión L7 y se inserta un catéter intratecal en el espacio subaracnoideo en L7. El catéter se desliza lenta y suavemente por encima de la médula espinal aproximadamente 1 mm caudal con respecto a la lesión. La parte del catéter que permanece fuera del espacio intratecal se sutura firmemente en su lugar al tejido circundante. Se conecta una bomba de cebado mini-osmótica (Alza Corp.) que contiene el material de ensayo (proteína Sp35 o proteína de control) al extremo expuesto de la cánula guía y se inserta en el espacio subcutáneo. Después de la cirugía, los sitios de la laminectomía se cubren con un material protector tal como Durafilm y el músculo suprayacente se sutura con catgut crómico 4.0 para proteger la columna vertebral expuesta. La piel se sutura y se limpia con una disolución de betadine.

Análisis histológico: la cirugía de trazado de conductos se produce en el momento de la cirugía para inducir la lesión de la médula espinal. La piel de la cabeza se afeita y se limpia con Betadine y alcohol del 70%. El animal se coloca en un marco estereotáxico. Se realiza una incisión longitudinal en el cuero cabelludo y el periostio se raspa de la bóveda craneal. Se perfora un orificio en el cráneo de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, y se inserta verticalmente una aguja de microlitro de vidrio en 8 ubicaciones en la corteza motora (las coordenadas se determinan de acuerdo con el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1997). Se inyectan aproximadamente 5

µl de material trazador de conductos (por ejemplo, Biotina dextrano amina, 10.000 M.Wt) y la aguja se deja en su lugar durante cinco minutos adicionales para permitir la difusión de la disolución. Después de la retirada de la aguja, el agujero del cráneo se tapona con espuma de gel y el cuero cabelludo se cierra con grapas sobre el sitio de la lesión. Se permite que los animales se recuperen y reciban cuidados postoperatorios (descrito más adelante). De cuatro a diez semanas más tarde los animales se anestesian profundamente (Inactin 100-110 mg/kg ip) y se perfunden para la histología como se describe a continuación. El trazador de conductos es portado mediante mecanismos de transporte anterógrado por el conducto espinal cortical hacia el extremo caudal de la médula espinal y proporciona un medio para cuantificar la conectividad anatómica dentro del conducto corticoespinal.

Para los experimentos de inmunohistoquímica, los animales se anestesian profundamente con Inactin (100-110 mg/kg IP) 2-8 semanas después de la cirugía para inducir la lesión. La cavidad del pecho se abre y se expone el corazón, para permitir la perfusión. Se inserta una cánula en el ventrículo izquierdo a través de la cual se impulsan lentamente 100 cc de PBS enfriado con hielo (se cortará un agujero en el ventrículo derecho para permitir el escape de líquido). Esto está seguido de un goteo lento pero constante de paraformaldehído al 4% (50-100 mL) hasta que resulte obvia la fijación de ojos/oidos/dedos de los pies. Las médulas espinales se eliminan, con cuidado para minimizar la alteración del sitio de la lesión, se congelan en OCT, se seccionan, y se procesan para la inmunohistoquímica. También se recogen opcionalmente otros tejidos para su posterior análisis. Los animales que reciben adenovirus Sp35 muestran un aumento de brotación axónica, determinado por tinción de tubulina βIII para el axón de la neurona.

Ejemplo 12: Constructos de vector viral con Sp-35

Se preparó un vector viral con Sp-35 derivado de pMIG como sigue. La secuencia codificante de Sp35 completa se amplificó mediante PCR utilizando cebadores 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37), que contenía un sitio XhoI, y 5'-CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAAGTGG-3' (SEQ ID NO: 38), que contenía un sitio EcoRI. El producto de PCR se cortó con XhoI y EcoRI, después se ligó en el vector de retrovirus pMIG (Cheng et al., 1996, Nat. Biotechnol. 145: 576) que se cortó con XhoI y EcoRI. Este vector se denominó pMMC078. Todos los productos aislados de pMMC078 contenían mutaciones puntuales, por lo que dos productos aislados de pMMC078 se ligaron entre sí. El Vector pMMC078.6 se cortó con XhoI y Accl y pMMC078.7 se cortó con XhoI y Accl. Estos dos fragmentos se ligaron para preparar el plásmido, pMMC089.

Un vector viral Sp35-HA derivado de pMIG se preparó como sigue. Un fragmento que codificaba los aminoácidos 326-614 de Sp35 en marco con la secuencia de HA se obtuvo mediante el uso de PCR con cebadores 5'-GCCTTCGCGCGCCTCAACTACCTGCGCGTG CTC-3' (SEQ ID NO: 39), que contenía un sitio SacII, y 5'-CCGGAATTCTCA AGCGTAATCAGGAACGTCGTAAGGGTATATCATCTTCATGTTGAAGTGGCGGGCGCGTCCGGC-3' (SEQ ID NO: 40), sirviendo como molde pMMC089. El cebador más largo incluye la secuencia codificante (cursiva) de HA después del codón 614 de Sp35 y antes del sitio EcoRI. El producto de PCR se cortó con Sac II y EcoR I, y se utilizó para sustituir el fragmento Sac II-EcoR I que contenía los codones 326-614 de Sp35 de tipo salvaje en el vector retroviral derivado de pMIG.

Se preparó un vector Sp35-HA de baculovirus de la siguiente manera. La secuencia codificante de Sp35-HA del vector retroviral Sp35-HA se cortó con Xho I y EcoR I, se formaron extremos romos, y se clonó en el sitio Bgl2 de relleno del vector lanzadera baculoviral pBV-CZPG (Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.190.887; y 6.338.953), reemplazando el gen LacZ bajo el promotor de CMV.

Se preparó un vector de adenoviral con Sp35 como sigue. La secuencia codificante Sp35-IRES-GFP del retroviral con Sp35 se cortó con XhoI de relleno y Nhe I, se clonó en los sitios Eco R1-relleno/Nhe I del vector lanzadera de adenovirus pDC315, bajo el promotor mínimo de CMV.

Ejemplo 13: Modelo Animal de remielinización

Se utilizan ratas Long Evans hembra en todos los estudios. Las ratas se anestesian utilizando isoflurano y se expone la T3/4 y se realiza una hemi-laminectomía dorsal. A continuación se inyecta el agente químico desmielinizante, lisolecitina (3 µl de lisolecitina al 1% en disolución salina al 0,9%), en el lado derecho de las columnas dorsales de la médula espinal 0,5-1 mm por debajo de la superficie de la médula). Se administra el tratamiento analgésico adecuado antes y después de la cirugía.

Tres días más tarde, el sitio de inyección se vuelve a exponer (bajo anestesia con isoflurano, con un tratamiento adecuado analgésico) y se inyectan las siguientes terapias en la médula espinal lesionada y se inyecta un vector de adenovirus que codifica la proteína Sp35/proteína de control en el sitio de la lesión. Se inyectarán 10^{10} partículas de adenovirus que codifican Sp35 o GFP de control en un volumen de 10 µl en la médula espinal de la rata lesionada hasta un máximo de 5 sitios diferentes en y alrededor del sitio de la desmielinización inducida por lisolecitina. Se inyecta un volumen de no más de 2 µl en cada uno de los 5 sitios de inyección. Para el análisis histológico de la desmielinización/remielinización de la médula espinal 2, 3, 4 o 6 semanas después de la cirugía, los animales se anestesian profundamente con inactina (100-110 mg/kg ip) y se perfunden con fijador a través del corazón. A continuación se retira la médula espinal y se procesa para su análisis. El animal que recibe tratamiento con Sp35 muestra una mayor mielinización axonal según se determina mediante IHC utilizando anticuerpos anti-proteína MBP

o azul rápido luxol.

Ejemplo 14: ARNi de Sp35

Para abordar el papel de Sp35 en la función cerebral, los autores de la presente invención se introdujo el ARNi lentiviral de Sp35 en células CGN 8 postnatales. Las células infectadas con ARNi de Sp35 tenían neuritas más cortos y mayores tasas de proliferación que las células de control. Estos resultados indican un papel de Sp35 en la regulación de la activación de RhoA.

Se compararon secuencias de ADN de Sp35 murina y de rata para encontrar regiones homólogas para su uso como ARNhc candidatos. Se construyó CH324 recociendo los oligonucleótidos LV1-035 y LV1-036 y ligándolos a pLL3.7 digerido con Hpa1 y Xho1. Los oligonucleótidos se adquirieron de MWG. Las secuencias son: LV1-035 (oligo efector) 5'TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCT AGCAGGATGACGATCTTTTTC (SEQ ID NO: 41) LV1-036 (oligo antisentido) 5'TCGAGAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTCTAGCAG GATGACGATCA (SEQ ID NO: 42).

Antes de la producción del virus, el ADN de pLL3.7 o el ARNhc candidato de pLL3.7 se cotransfectaron con plásmido SP35 murino etiquetado con HA a una razón de 5 a 1 en células CHO en un formato de 6 pocillos. La expresión reducida "knockdown" se analizó mediante detección por transferencia Western de SP35 etiquetado con HA a partir de productos lisados de células CHO transfectadas así como por transferencia de Northern del ARN total preparado a partir de pocillos duplicados. La transferencia se sondeó con un fragmento de 0,7 kb de mSP35. Los análisis se realizaron 48 horas después de la transfección (datos no mostrados). Los virus se produjeron a partir del mejor candidato para su uso en cultivos neuronales de rata. El vector, la metodología adicional y la producción de virus fueron los descritos por Robinson et al. "A lentivirus-bases system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference". Nat. Genet. 33, 401-6 (2003).

Ejemplo 15: Activación de RhoA

Las células COS7 que co-expresaban NgR1 y SP35 no mostraron cambios en los niveles de RhoA/GTP en respuesta a OMgp. Esto sugirió que el complejo SP35/NgR1 no es suficiente para mediar la transducción de señales por un inhibidor de mielina.

Los autores de la presente invención exploraron la posibilidad de que un complejo ternario de SP35/NgR1/p75 mediara la señalización. Se utilizaron dos enfoques para evaluar las interacciones entre Sp35, NgR1 y p75. En primer lugar, la unión se evaluó en un análisis de unión directa utilizando un producto conjugado de AP-SP35. El producto conjugado de AP-SP35 se unió débilmente a células que expresaban p75. AP-P75 se unió a células que expresaban NgR1. La unión de AP-SP35 a NgR1 y p75 se midió mediante ELISA (Fig. 4). En segundo lugar, la unión de SP35 a NgR1 y p75 se evaluó mediante co-inmunoprecipitación a partir de células COS7 que expresaban simultáneamente SP35, NgR1 y p75. Un anticuerpo anti-NgR1 inmunoprecipitó un complejo que contenía SP35 y p75. Un anticuerpo anti-SP35 también inmunoprecipitó un complejo que contenía p75. Los datos de interacción y co-inmunoprecipitación proporcionaron pruebas de una interacción directa entre SP35, NgR1 y p75. Los autores de la presente invención utilizaron la microscopía confocal y anticuerpos contra SP35, p75 y NgR1 para demostrar que SP35, NgR1 y p75 se co-localizan en los cuerpos celulares y los axones de las neuronas GC p7 de rata.

A continuación los autores de la presente invención demostraron que la combinación de SP35, NgR1 y p75 es suficiente para las actividades del inhibidor de mielina. Se modificaron genéticamente células COS7 no neuronales para expresar los tres componentes. Utilizando estas células, los autores de la presente invención demostraron que los niveles de RhoA/GTP estaban regulados al alza por OMgp. El tratamiento con OMgp-Fc aumentó los niveles de RhoA/GTP en las células que expresaban simultáneamente p75/SP35/NgR1, en comparación con otras combinaciones de estos tres componentes. Los autores de la presente invención confirmaron la expresión de las proteínas mediante transferencia Western de productos lisados de células COS7. La afinidad de los inhibidores de mielina que se unían a NgR1 no se vio afectada por la presencia de p75 o p75 y Sp35. Los resultados combinados apoyan un modelo mediante el cual se requiere un complejo ternario de NgR1, SP35 y p75 para la regulación de RhoA en presencia de ligandos de NgR1 (Fig. 5).

SP35 contiene un dominio citoplásmico que tiene potencial de participación directa o indirecta en la señalización. Para determinar el papel del dominio citoplásmico, los autores de la presente invención produjeron un truncamiento del dominio citoplásmico de Sp35 (aminoácidos 34 a 576 del SEQ ID NO: 2), para que funcionara de una manera dominante negativa mediante la formación de un complejo ternario improductivo incapaz de señalización. Los autores de la presente invención denominaron esta molécula con truncamiento del dominio citoplásmico "DN-Sp35" (por SP35 dominante negativo). Los autores de la presente invención transfectaron neuronas CG 7 días postnatales (P7) con SP35 completa o DN-Sp35, y a continuación analizaron la respuesta a los componentes inhibidores de mielina (OMgp, mielina y Nogo66). Como se muestra en la FIG. 6, las células transfectadas DN-Sp35 no lograron responder a los componentes inhibidores de mielina y mostraron neuritas más largas que los controles. En contraste, las células transfectadas con el constructo de Sp35 completo mostraron una intensificación de la respuesta a los sustratos inhibidores, y tuvieron neuritas más cortas en comparación con los controles. Esto demuestra que DN-Sp35 actúa como un competidor para atenuar la inhibición de la proyección de las neuritas causada por los

componentes de la mielina. Los autores de la presente invención esperaban que Sp35-Fc soluble, exógena también se uniera a NgR1 y bloqueara la acción de los sustratos inhibidores. Como se muestra en la FIG. 7, Sp35-Fc redujo la inhibición de la proyección de las neuritas por OMgp, Nogo66 y MAG.

Ejemplos 16: actividad neuroprotectora

- 5 Se cultivaron en placa cantidades iguales de neuronas granulares del cerebelo p6 rata en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 12 pocillos en presencia o ausencia de 50 nM de proteína sp35-Fc. Estas placas de poli-D-lisina se habían recubierto previamente [secado] con 10 µg de mielina del SNC, o 200 ng de Nogo66, MAG y OMgp o control-Fc. Los cultivos neuronales se mantuvieron durante 1-7 días en CO a 37°C y CO₂ al 5%. Las neuronas estaban sanas y crecieron bien en los pocillos de control con PBS con independencia del tratamiento con sp35-Fc
- 10 con extensión completa de las neuritas [determinada mediante un marcador específico neuronal, tubulina βIII] como se examinó después de 3 días. En ausencia de sp35-Fc, las neuronas no crecieron bien en los pocillos recubiertos con mielina, Nogo66, MAG y OMgp. Hubo una mínima brotación de neuritas [corta y distorsionada] y las neuronas no parecían estar sanas, con un cuerpo celular redondeado y materiales nucleares condensados. La tinción DAPI demostró que el número de neuronas detectadas en estos pocillos fue menor que en los pocillos de control con PBS,
- 15 lo que sugiere la pérdida neuronal. En presencia de sp35-Fc, estuvieron presentes neuritas largas y las neuronas parecían sanas. La tinción con DAPI demostró un número neuronal mayor en estos pocillos que los que no recibieron el sp35-Fc. Los datos se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

<u>En ausencia de sp35-Fc</u>		
sustrato seco:	OMgp/Nogo/MAG/mielina	Control de Fc
extensión de neuritas	corta distorsionada	larga extendida
morfología del cuerpo celular	redondeada	diseminada
materiales nucleares	condensados	claros
número de neuronas al final del expt	reducido	igual que Fc de control
<u>En presencia de sp35-Fc</u>		
sustrato seco:	OMgp/Nogo/MAG/mielina	Control de Fc
extensión de neuritas	larga extendida	larga extendida
morfología del cuerpo celular	diseminada	diseminada
materiales nucleares	claros	claros
número de neuronas al final del expt	menos reducido que FC de control	igual que Fc de control

Estos datos indican que una forma soluble de Sp35, p. ej., Sp35-Fc, posee actividad neuroprotectora.

5 En ratas con médula espinal hemi-transectada (T9, SCT), la tinción de tubulina β III de las secciones de médula espinal mostró una pérdida sustancial de neuronas en el sitio de la lesión. Se utilizó un virus recombinante que expresaba sp35 para infectar los animales SCT en el sitio de la lesión. La tinción histológica de estas médulas espinales mostró un aumento del número de neuronas alrededor del sitio de la lesión en comparación con el grupo de control que se había infectado con el virus vector. Esto es congruente con los descubrimientos experimentales *in vitro* descritos anteriormente, e indica adicionalmente las propiedades neuroprotectoras asociadas con Sp35.

10 Ejemplo 17: Sp35 en modelo animal de lesión de la médula espinal

15 Puesto que Sp35-Fc reduce la inhibición de la proyección de las neuritas causada por OMgp, Nogo-66 y MAG *in vitro*, los autores de la presente invención esperaban que la molécula promoviera la recuperación funcional de las lesiones del SNC *in vivo*. Para confirmar esto, los autores de la presente invención administraron Sp35-Fc a ratas con la médula espinal hemiseccionada, es decir, un modelo animal de traumatismo agudo del SNC. Como se muestra en la FIG. 8 y la FIG. 9, las ratas tratadas con Sp35-Fc demostraron una recuperación funcional significativamente mejorada, en comparación con las ratas de control tratadas con IgG.

20 La lesión de la médula espinal y el análisis de comportamiento se realizaron de la siguiente manera. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron de acuerdo con las directrices del Biogen Institutional Animal Use and Care Committee. Se anestesiaron ratas Long Evans hembra (190-210 g, Charles River, Wilmington, MA) utilizando 2,5 mg/kg de midazolam, IP y Flutano al 2-3% en O₂. Se realizó una laminectomía dorsal a nivel espinal T6 y T7. Se realizó una hemisección dorsal, interrumpiendo completamente los componentes del conducto corticoespinal (CST) dorsomedial principal y dorsolateral minoritario. Inmediatamente después de la transección CST se insertó un catéter intratecal en el espacio subaracnoideo en T7 y se conectó a una bomba mini-osmótica cebada (modelo Alzet 2004) insertada en el espacio subcutáneo. Las bombas mini-osmóticas suministraron la proteína de control de isotipo de Hu IgG (5 mg/ml, n = 5, Pharmingen), PBS (n = 3), proteína de fusión Hu Sp35-Ig soluble (4,3 mg/ml, n = 8) a una velocidad de 0,25 μ l/h. Después de la cirugía, el sitio de la laminectomía se suturó y la herida de la piel se suturó con grapas. Los cuidados postoperatorios incluyen analgesia (buprenorfina 0,05 mg/kg sc) durante 3 días y tratamiento con antibióticos (ampicilina 100 mg/kg sc dos veces al día) durante 7 días después de la cirugía. Las vejigas se exprimieron manualmente dos veces al día durante la duración del estudio (28 días) o hasta el regreso de la función

(momento que se anotó). Todos los animales se valoraron de forma ciega utilizando el sistema de puntuación BBB de campo abierto (Basso et al., 1995, *J. Neurotrauma* 12:1-21; Ono et al., 2003, *J. Neurosci.* 23: 5.887-5.896). Las ratas se evaluaron el día después de la transección CST (día 2) y después semanalmente durante 4 semanas utilizando la escala de clasificación locomotora de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Los investigadores estuvieron ciegos a los grupos de tratamiento durante la duración del estudio.

Ejemplo 18: supervivencia neuronal y regeneración axonal en el modelo de lesión POR hemi-sección del conducto rubro-espinal (RST):

Los autores de la presente invención también investigaron los efectos del tratamiento con Sp35 sobre la regeneración de las neuronas en el conducto rubro-espinal que contribuyen directamente a la locomoción.

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de edad, adultos (200-250 g) con una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg). Bajo un microscopio quirúrgico, se realizó una laminectomía dorsal y se identificó la séptima vértebra espinal torácica (C7). Después de abrir la duramadre, se realizó una hemisección derecha a nivel de la médula espinal C7 utilizando un par de tijeras de resorte. Después de la hemi-sección de la médula espinal, los animales recibieron un trozo de espuma de gel empapada con 10 µl de una disolución 2 µg/ml de Sp35-Fc, o 10 µl de una disolución de 2 µg/ml de Ig humana, o 10 µl PBS, colocado en la parte superior del sitio de la lesión. Después de las operaciones, los animales de cada grupo se subdividieron para determinar el trazado axonal y el análisis de comportamiento. Se dejó que los animales para el trazado axonal (n = 5 para cada grupo) y el análisis de comportamiento (n = 7 para cada grupo) sobrevivieran durante 1 mes.

Se utilizó fluoro-Gold (FG, 6% p/v, Fluorocromo) para etiquetar las neuronas RST que se habían regenerado sus axones a través de la cicatriz de la lesión y habían vuelto a entrar en la médula espinal caudal. Dos días antes de la finalización del periodo de supervivencia después de la lesión (1 mes), los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg). Se llevó a cabo una laminectomía dorsal y se identificó el segmento espinal T2. Se inyectó manualmente FG a un volumen de 0,5 mL en la médula espinal T2 del lado derecho utilizando una jeringa Hamilton. Dos días más tarde, los animales se anestesiaron y se sacrificaron con una dosis letal de ketamina (150 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) y se perfundieron de forma intracardiaca con disolución salina normal, seguido de 400 mL de fijador que contenía paraformaldehído al 4% en 0,1 x PBS. Los cerebros y las médulas espinales se retiraron, se fijaron posteriormente con paraformaldehído durante la noche, y a continuación se colocaron en sacarosa tamponada con fosfato al 30%. El cerebro y el tejido de la médula espinal se cortaron en secciones de 30 mm en un criostato y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina. El número de neuronas RST marcadas con FG en el lado de la lesión se expresó como un porcentaje del número total de neuronas marcadas con FG en el lado intacto contra-lateral. Este porcentaje entre los grupos se comparó estadísticamente usando ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Como se muestra en la Tabla 3, Sp35-Fc a 2 µg/ml promovió la supervivencia de las neuronas del conducto-rubro espinal (RST).

Tabla 3

Tratamiento	Porcentaje de supervivencia de neuronas de RST (± E. T. M.)
PBS	17,1 ± 2
Sp35-Fc	31,9 ± 1,5
Control-Fc	14,5 ± 2,1

Para el análisis del comportamiento, se examinó el uso de las extremidades anteriores durante la exploración vertical espontánea 1 mes después de diferentes tratamientos como se ha descrito (Liu et al., 1999) con pequeñas modificaciones. Las ratas se colocaron en un cilindro de plexiglás transparente (15 cm de diámetro y 30 cm de altura) que fomenta el uso de las extremidades anteriores para la exploración vertical durante 5 min. Se puntuaron los siguientes comportamientos: (1) uso independiente de las extremidades anteriores izquierda (intacta) o derecha (deteriorada) para ponerse en contacto con la pared del cilindro; y (2) uso simultáneo de las dos extremidades anteriores para ponerse en contacto con la pared del cilindro. El comportamiento de exploración vertical, se expresó en términos de (1) porcentaje de uso de la extremidad anterior izquierda (intacta) con respecto a la cantidad total de uso de las extremidades deterioradas, no deterioradas, y ambas; (2) porcentaje de uso de la extremidad anterior derecha (deteriorada) con respecto a la cantidad total de uso de las extremidades deterioradas, no deterioradas, y ambas; y (3) porcentaje de uso de ambas extremidades anteriores con respecto a la cantidad total de uso de las extremidades deterioradas, no deterioradas, y ambas. Las diferencias entre los grupos se sometieron a ensayo mediante ANOVA de una vía seguido por un análisis post hoc de Bonferroni. Los animales tratados Sp35-Fc

mostraron una movimiento significativamente mejorado de la extremidad anterior: uso de 30% para ambas extremidades anteriores en animales tratados con Sp35-1-Fc en comparación con el uso de 10% para ambas extremidades anteriores en animales tratados con el control-Fc o PBS; uso de 55% de la izquierda extremidad (intacta) en comparación con el uso de 80% en los animales tratados con el control-Fc o PBS; y uso de 29% de la extremidad derecha (deteriorada) en comparación con aproximadamente 15% en los animales tratados con el control-Fc o PBS.

Ejemplo 19: Sp35-Fc promueve la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) en el modelo de transección del nervio óptico

Los autores de la presente invención confirmaron adicionalmente la actividad de Sp35 utilizando el modelo de transección del nervio óptico, que investiga los factores que afectan a la función neuronal. Se utilizaron en este estudio ratas Sprague Dawley (SD) hembra adultas jóvenes. Se transeccionó de forma intraorbital el nervio óptico derecho de cada animal 1,5 mm desde la papila óptica. Se aplicó un trozo de espuma de gel empapada con fluoro-Gold (FG) al 6% al sitio recién transeccionado justo detrás de la papila óptica para marcar las células ganglionares de la retina (CGR) supervivientes. Los animales se dividieron en 6 grupos (n = 6 en cada grupo) que recibieron Sp35-Fc, IgG1 humana, o solo PBS, mediante inyección intravítrea. El volumen de cada inyección intravítrea fue de 4 mL, mientras que la dosis de cada inyección fue de 2 mg. Las inyecciones intravítreas se realizaron inmediatamente después de la transección del nervio óptico.

Se permitió que todos los animales sobrevivieran durante 1 semana. Dos días antes de sacrificar los animales, se transeccionó el nervio óptico izquierdo de cada animal y se utilizó FG al 6% para marcar las RGC supervivientes para que sirvieran como control interno. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de Nembutal y las retinas se disecaron en paraformaldehído al 4%. Se realizaron cuatro cortes radiales para dividir las retinas en cuatro cuadrantes (superior, inferior, nasal y temporal). Las retinas se post-fijaron después en el mismo fijador durante 1 hora antes de que se montaran en plano con el medio de montaje (Dako). Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro ultravioleta (longitud de onda de excitación = 330 a 380 nm). Las RGC marcadas se contaron a lo largo de la línea media de cada uno de los cuadrantes partiendo de la papila óptica hasta el límite periférico de la retina a intervalos de 500 µm, con una rejilla ocular de 200 X 200 µm. El porcentaje de RGC supervivientes resultantes de cada tratamiento se expresó mediante la comparación del número de RGC supervivientes en los ojos lesionados con sus ojos contra-laterales. Todos los datos se expresan como media ± ETM. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas para p < 0,05. Los animales tratados Sp35-Fc mostraron supervivencia neuronal significativa (83%) cuando se compararon con los animales tratados con control-Fc o PBS, que mostraron cada uno solo aproximadamente 50% de supervivencia neuronal.

Otras realizaciones

Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen a continuación y se conocen como realizaciones E1 a E57.

E1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en donde: (a) el polipéptido comprende (i) un dominio LRR de Sp35, (ii) una región alcalina de Sp35 C-terminal con respecto al dominio LRR, y (iii) una dominio de inmunoglobulina (Ig) de Sp 35 C-terminal con respecto a la región alcalina; y (b) el polipéptido carece de un dominio transmembrana.

E2. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en donde el polipéptido comprende un dominio Ig de Sp35 y carece de un dominio LRR de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E3. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en donde el polipéptido comprende un dominio LRR de Sp35 y carece de un dominio Ig de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E4. El ácido nucleico de E1, en donde el polipéptido Sp35 carece de un dominio citoplásmico.

E5. El ácido nucleico de E1, en donde el polipéptido comprende los residuos de aminoácido 34 a 532 del SEQ ED NO: 2.

E6. El ácido nucleico de una cualquiera de E1-3, en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende un radical que no es de Sp35.

E7. El ácido nucleico de E6, en donde el radical que no es de Sp35 se selecciona del grupo que consiste en un radical de Ig, un radical de albúmina de suero, un radical de direccionamiento, un radical informador, y un radical que facilita la purificación.

E8. El ácido nucleico de E7, en donde el radical que no es de Sp35 es un radical de Ig.

E9. El ácido nucleico de E8, en donde el radical de Ig es un radical Fc.

E10. El ácido nucleico de una cualquiera de E1-3, en donde la secuencia de nucleótidos está conectada operativamente a una secuencia de control de la expresión.

E11. Un vector que comprende el ácido nucleico de E10.

5 E12. Una célula anfitriona que comprende el vector de E11.

E13. Un polipéptido aislado, en donde: (a) el polipéptido comprende (i) un dominio LRR de Sp35, (ii) una región alcalina de Sp35 C-terminal con respecto al dominio LRR, y (iii) un dominio de inmunoglobulina (Ig) C-terminal con respecto a la región alcalina; y (b) el polipéptido carece de un dominio transmembrana.

10 E14. Un polipéptido aislado en donde el polipéptido comprende un dominio de Ig Sp35 y carece de un dominio LRR, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E15. Un polipéptido aislado en donde el polipéptido comprende un dominio LRR de Sp35 y carece de un dominio Ig de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E16. El polipéptido de E13, en donde una de las repeticiones ricas en leucina es una repetición rica en leucina carboxi terminal (LRRCT).

15 E17. El polipéptido de E13, en donde una de las repeticiones ricas en leucina es una repetición rica en leucina amino terminal (LRRNT).

E18. El polipéptido de E13, en donde el polipéptido Sp35 carece de un dominio citoplásmico.

E19. El polipéptido de E13, en donde el polipéptido comprende los residuos de aminoácido 34 a 532 del SEQ ID NO: 2.

20 E20. El polipéptido de E13, 14 o 15, en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende un radical que no es de Sp35.

E21. El polipéptido de E20, en donde el radical que no es de Sp35, se selecciona del grupo que consiste en un radical Ig, un radical de albúmina de suero, un radical de direccionamiento, un radical informador, y un radical que facilita la purificación.

25 E22. El polipéptido de E21, en donde el radical que no es de Sp35 es un radical de Ig.

E23. El polipéptido de E22, en donde el radical de Ig es un radical Fc.

E24. El polipéptido de E13, 14 o 15, en donde el polipéptido está conjugado a un polímero.

E25. El polipéptido de E24, en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste de un polialquilenglicol, un polímero de azúcar, y un polipéptido.

30 E26. El polipéptido de E25, en donde el polímero es un polialquilenglicol.

E27. El polipéptido de E26, en donde el polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG).

E28. El polipéptido de E24, en donde el polipéptido se conjuga con 1, 2, 3 o 4 polímeros.

E29. El polipéptido de E28, en donde el peso molecular total de los polímeros es de 20.000 Da a 40.000 Da.

35 E30. Un método para inhibir la transducción de señales por medio de NgR1, que comprende poner en contacto el NgR1 con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35.

E31. Un método para disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC), comprende poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

40 E32. Un método para inhibir el colapso del cono de crecimiento de una neurona del SNC, que comprende poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

45 E33. Un método para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido Sp35, un anticuerpo anti-Sp35, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-Sp35.

E34. El método de una cualquiera de E30-33, en donde el polipéptido Sp35 se selecciona del grupo que consiste en

un polipéptido, en donde: (a) el polipéptido comprende (i) un dominio LRR que comprende 12-14 repeticiones ricas en leucina de Sp35, (ii) una región alcalina de Sp35 C-terminal con respecto al dominio LRR, y (iii) un dominio de inmunoglobulina (Ig) C-terminal con respecto a la región alcalina; y (b) el polipéptido carece de un dominio transmembrana; y

un polipéptido en donde el polipéptido comprende un dominio Ig de Sp35 y carece de un dominio LRR, una región alcalina, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E35. El método de E33, en donde la enfermedad, trastorno o lesión del SNC es una lesión de la médula espinal o una lesión del nervio óptico.

E36. El método de E33, en donde el polipéptido se administra localmente.

E37. El método de E33, en donde el polipéptido se administra inicialmente dentro del plazo de 48 horas desde la lesión de la médula espinal.

E38. El método de E36, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido es de 10 µg a 10 mg.

E39. Un método para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC en un mamífero, que comprende (a) proporcionar una célula anfitriona cultivada que expresa un polipéptido Sp35 recombinante; y (b) introducir la célula anfitriona en el mamífero en o cerca del sitio de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC.

E40. El método de E39, en donde la enfermedad, trastorno o lesión es una lesión de la médula espinal.

E41. El método de E39, en donde la célula anfitriona cultivada deriva del mamífero que se va a tratar.

E42. El método de E39, en donde el polipéptido Sp35 recombinante es un polipéptido Sp35 completo.

E43. Un método para promover la mielinización en el sitio de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC, que comprende poner en contacto el sitio de la enfermedad, trastorno o lesión del SNC con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35.

E44. El método de E43, en donde el polipéptido Sp35 comprende un dominio LRR de Sp35 y carece de un dominio Ig de Sp35, una región alcalina de Sp35, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico.

E45. Un método para tratar una enfermedad, trastorno o lesión del SNC mediante terapia génica *in vivo*, que comprende administrar a un mamífero, en o cerca del sitio de la enfermedad, trastorno o lesión, un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Sp35 de modo que el polipéptido Sp35 se expresa a partir de la secuencia de nucleótidos en el mamífero en una cantidad suficiente para reducir la inhibición de la extensión axonal por las neuronas en o cerca del sitio de la lesión.

E46. El método de E36, en donde el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector adenoviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papovaviral, un vector viral de vaccinia, y un vector viral de herpes simplex.

E47. El método de E45, en donde la enfermedad, trastorno o lesión se selecciona del grupo que consiste en lesión de la médula espinal y lesión del nervio óptico.

E48. El método de E45, en donde el vector viral se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en administración tópica, administración intraocular, administración parenteral, administración intratecal, administración subdural y administración subcutánea.

E49. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un dominio LRR de Sp35, una región alcalina, un dominio Ig, una secuencia de conexión, y un dominio transmembrana; y carece de un dominio citoplásmico funcional.

E50. El ácido nucleico de E49, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que consiste esencialmente de los aminoácidos 1 a 576 del SEQ ID NO: 2.

E51. Un método para promover la supervivencia de una neurona en riesgo de muerte, que comprende poner en contacto la neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido Sp35.

E52. El método de E51, en donde la neurona está *in vitro*.

E53. El método de E51, en donde la neurona está en un mamífero con una enfermedad, trastorno o lesión neurodegenerativos.

E54. El método de E53, en donde la enfermedad, trastorno o lesión neurodegenerativos se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis múltiple, ELA, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, ictus, lesiones cerebrales traumáticas y lesión de la médula espinal.

5 E55. Un método para promover la supervivencia de una neurona en riesgo de muerte en un mamífero con una enfermedad, trastorno o lesión neurodegenerativos, que comprende (a) proporcionar una célula anfitriona cultivada que expresa un polipéptido Sp35 recombinante; y (b) introducir la célula anfitriona en el mamífero en el sitio de la neurona.

10 E56. Un método de terapia génica *in vivo* para promover la supervivencia de una neurona en riesgo de muerte, que comprende administrar a un mamífero, en o cerca del sitio de la neurona, un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Sp35 de manera que el polipéptido Sp35 se exprese a partir de la secuencia de nucleótidos en el mamífero en una cantidad suficiente para promover la supervivencia de la neurona.

E57. El método de E51, en donde el polipéptido Sp35 es soluble.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> PROTEÍNA DE UNIÓN DEL RECEPTOR DE NOGO

5 <130> P27914EP-PCT

<140> EP04757823.2

<141> 17-03-2004

10 <150> 60/455.756

<151> 19-03-2003

<150> 60/480.241

15 <151> 20-06-2003

<150> 60/492.057

<151> 01-08-2003

20 <160> 41

<170> PatentIn ver. 3.2

<210> 1

25 <211> 2897

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30 <221> base_modificada

<222> (2376)

<223> n = a, t, c o g

<220>

35 <221> base_modificada

<222> (2381)

<223> n = a, t, c o g

<220>

40 <221> base_modificada

<222> (2859)

<223> n = a, t, c o g

<220>

45 <221> base_modificada

<222> (2861)

<223> n > a, t, c o g

<220>

50 <221> base_modificada

<222> (2871)

<223> n = a, t, c o g

<220>

55 <221> base_modificada

<222> (2877)

<223> n = a, t, c o g

<220>

60 <221> base_modificada

<222> (2880)

<223> n = a, t, c o g

<400> 1

ggagagacat	gcgattgggtg	accgagccga	gcggaccgaa	ggcgcgccc	agatgcaggt	60
gagcaagagg	atgtctggcgg	ggggcgtag	gagcatgccc	agccccctcc	tggcctgctg	120
gcagcccatc	ctcctgctgg	tgtctggctc	agtgtctgtca	ggctcggcca	cgggctgccc	180
gccccgctgc	gagtgctccg	cccaggaccg	cgctgtgtctg	tgccaccgca	agcgttttgt	240
ggcagtcctc	gagggcatcc	ccaccgagac	gcgcctgtctg	gacctaggca	agaaccgcat	300
caaaacgctc	aaccaggacg	agttcgccag	cttcccgcac	ctggaggagc	tggagctcaa	360
cgagaacatc	gtgagcgccg	tggagccccg	cgcttcaac	aacctcttca	acctccgac	420
gctgggtctc	cgcagcaacc	gcctgaagct	catcccgtca	ggcgtcttca	ctggcctcag	480
caacctgacc	aagctggaca	tcagcgagaa	caagattgtt	atcctactgg	actacatgtt	540
tcaggacctg	tacaacctca	agtcactgga	ggttggcgac	aatgacctcg	tctacatctc	600
tcaccgcgcc	ttcagcggcc	tcaacagcct	ggagcagctg	acgctggaga	aatgcaacct	660
gacctccatc	ccacccgagg	cgctgtccca	cttgacaggg	ctcatcgctc	tgaggctccg	720
gcacctcaac	atcaatgcca	tccgggacta	ctccttcaag	aggctctacc	gactcaaggt	780
cttgagagatc	tcccactggc	cctacttgga	caccatgaca	cccaactgcc	tctacggcct	840
caacctgacg	tccctgtcca	tcacacactg	caatctgacc	gctgtgccct	acctggccgt	900
ccgcaccta	gtctatctcc	gcttctcctaa	cctctcctac	aaccccatca	gcaccattga	960
gggtctccatg	ttgcatgagc	tgctccggct	gcaggagatc	cagctgggtg	gcgggcagct	1020
ggcgtgggtg	gagccctatg	ccttccgctg	cctcaactac	ctgcgcgtgc	tcaatgtctc	1080
tggcaaccag	ctgaccacac	tggaggaatc	agtcttccac	tcggtgaggca	acctggagac	1140
actcatcctg	gactccaacc	cgctggcctg	cgactgtcgg	ctcctgtggg	tggtccggcg	1200
ccgctggcgg	ctcaacttca	accggcagca	gcccacgtgc	gccacgccc	agtttgtcca	1260
gggcaaggag	ttcaaggact	tccctgatgt	gctactgccc	aactacttca	cctgccgccg	1320
cgcccgcatc	cgggaccgca	aggcccagca	ggtgtttgtg	gacgagggcc	acacgggtga	1380
gtttgtgtgc	cgggcccgatg	gcgacccgcc	gcccgcctac	ctctggctct	caccccgaaa	1440
gcacctggtc	tcagccaaga	gcaatgggcg	gctcacagtc	ttcctgatg	gcacgtgga	1500
ggtgcgttac	gcccagggtac	aggacaacgg	cacgtacctg	tgatcgccg	ccaacgcggg	1560
cggcaacgac	tccatgcccc	cccacctgca	tgtgcgcagc	tactcgccc	actggcccca	1620
tcagcccaac	aagaccttcg	ctttcatctc	caaccagccg	ggcgaaggag	aggccaacag	1680
caccgcgcc	actgtgcctt	tccccttcga	catcaagacc	ctcatcatcg	ccaccaccat	1740
gggtttcatc	tctttccttg	gcgtcgctcct	cttctgcctg	gtgctgctgt	ttctctggag	1800
ccggggcaag	ggcaacacaa	agcacaacat	cgagatcgag	tatgtgcccc	gaaagtcgga	1860
cgacggcatc	agctccgccc	acgcgccccg	caagttcaac	atgaagatga	tatgagggcg	1920
gggcgggggg	cagggaacccc	cgggcggccg	ggcaggggaa	ggggcctggc	cgccacctgc	1980
tactctcca	gtccttccca	cctcctccct	acccttctac	acacgttctc	tttctccctc	2040
ccgctccgt	cccctgctgc	cccccgccag	ccctcaccac	ctgccctcct	tctaccagga	2100
cctcagaagc	ccagacctgg	ggaccccacc	tacacagggg	catgacaga	ctggagttag	2160
aagccgacga	accgacacgc	ggcagagtca	ataattcaat	aaaaaagtta	cgaactttct	2220
ctgtaacttg	ggtttcaata	attatggatt	tttatgaaaa	cttgaaataa	taaaaagaga	2280
aaaaaactat	ttcctatagc	tagtcggaat	gcaaaccttt	gacgtcctga	ttgtccagg	2340
gcccctcttc	aactcagttt	cttgtttttc	tcttctctct	nctcctcttc	ttctcctttt	2400
ctcttctctt	ccccagtggt	ggagggatca	ctcaggaaaa	caggaaagga	ggttccagcc	2460
ccaccacctc	gcccaccccc	ccccaggcac	catcaggagc	aggctagggg	gcaggcctgg	2520
gcccagctcc	gggctggctt	tttgacgggc	gcaggtggag	gggacaggtc	tgccgatggg	2580
ggtgggagcc	tgtctgctgg	gctgccaggc	ggcaccactg	caaggggtgg	gagcctggct	2640
cgggtgtggc	tgagactctg	gacagaggct	ggggctcttc	tgggggacag	cacagttagt	2700
ggagagagcc	aggggctgga	ggtggggccc	accccagcct	ctgggtccag	ctctgctgct	2760
cacttgctgt	gtggccctca	agcaggtcca	ctggcctctc	tgggcctcag	tctccacatc	2820
tgtacaaatg	ggaacattac	cccctgccct	gcctacctna	nagggctggt	ntgaggnatn	2880
gatgagatga	tgtatgt					2897

<210> 2
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1 5 10 15
Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
20 25 30
Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
35 40 45
Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
50 55 60
Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
65 70 75 80
Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
85 90 95
Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
100 105 110
Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
115 120 125

Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
 130 135 140
 Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
 145 150 155 160
 Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
 165 170 175
 Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
 180 185 190
 Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
 195 200 205
 His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
 210 215 220
 Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
 225 230 235 240
 Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255
 Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
 260 265 270
 Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 275 280 285
 Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
 290 295 300
 Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val
 305 310 315 320
 Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val
 325 330 335
 Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val
 340 345 350
 Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp
 355 360 365
 Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn
 370 375 380
 Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg
 405 410 415
 Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
 420 425 430
 Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
 435 440 445
 Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
 450 455 460
 Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
 465 470 475 480
 Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
 485 490 495
 Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
 500 505 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
515 520 525
Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
530 535 540
Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
545 550 555 560
Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
565 570 575
Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
580 585 590
Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
595 600 605
Phe Asn Met Lys Met Ile
610

<210> 3
<211> 59
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
10 <400> 3

tcgagaaaaa agatcgctcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59

<210> 4
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 5
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
25
Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg
1 5

<210> 6
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys
1 5

10 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 8

Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 9

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

25 **Met Gln Val Ser Lys Arg**
1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5

35 <210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 11

Ile Thr Pro Lys Arg Arg
1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Cys Pro His His Lys
1 5

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Val Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 14

aaggcccagc aggtgtttgt gga

23

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 15

tactcgatct cgatgtttgtg cttt

24

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 16

cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt

37

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

cagcaggtcg acctcgcccc gctggttgg

29

<210> 18
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador		
5	<400> 18		
	aattaagaat tcacgggctg cccgccccgc tgcgagt		37
10	<210> 19 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
15	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador		
	<400> 19		
20	tatatttcta gatcactcgc ccggctgggt ggagatgaaa gcga		44
25	<210> 20 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
30	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador		
	<400> 20		
	cttgacacgg gatccgcggc cgcattgctgg cggggggcgt gagg		44
35	<210> 21 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador		
	<400> 21		
	gcagcggggc gggcagcccg tggccgagcc tgacagcact gagcc		45
45	<210> 22 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
50	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador		
	<400> 22		
55	cttgacacgg gatccgcggc cgcattgctgg cggggggcgt gagg		44

5	<210> 23 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
10	<400> 23 gtcccggatg cgggcgcggg ccgagcctga cagcactgag cccag	45
15	<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial sequence <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
20	<400> 24 atattctaga atgctggcgg ggggcgtgag	30
25	<210> 25 <212> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 25 atatactagt gtcgttgccg cccgcgttgg	30
40	<210> 26 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
45	<400> 26 cccagcaggt gtttgtggac gaggatcta gggccgcgga tccctg	46
50	<210> 27 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
55	<400> 27	

cāgggātccg cggccctaga tcactcgtcc acaaacacct gctggg

46

5 <210> 28
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 28

cggcgcgcac ccgggtgaat tccgcgcccg catccgggac cgc

43

15 <210> 29
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 29

25 **gcgggtcccgg atgcggggcgc ggaattcacc cgggtgcgcg gcg**

43

30 <210> 30
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

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

35 <400> 30

cggcgcgcac ccgggtgaat tcgcccagca ggtgtttgtg gac

43

40 <210> 31
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 31

50 **gtccacaaac acctgctggg cgaattcacc cgggtgcgcg gcg**

43

<210> 32
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 32

5 **catcctctgg ctctcaccg aaaagggtact ggtctcagcc aagagc** 46

<210> 33

<211> 46

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

15 <400> 33

gctcttgggt gagaccagta ccttttcggg tgagagccag aggatg 46

<210> 34

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

25

Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 35

<211> 31

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

35

<400> 35

aattaagcgg ccgcatgctg gcggggggcg t 31

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 36

50 **aattaagcgg ccgctttgtc atgt** 24

<210> 37

<211> 32

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 37	
10	gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg	32
	<210> 38	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 38	
20	cgcggaatt ctcatatcat cttcatgttg aacttg	36
	<210> 39	
	<211> 33	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 39	
	gccttcgcg gcctcaacta cctgcgcgtg ctc	33
35	<210> 40	
	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 40	
45	ccggaattct caagcgtaat caggaacgtc gtaagggat atcatcttca tgttgaactt	60
	gcggggcgcg tcggc	75
	<210> 41	
	<211> 55	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
55	<400> 41	

tgatcgatcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen al polipéptido del SEQ ID NO: 2 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno neurodegenerativos, en los que la extensión axonal sería beneficiosa en un mamífero, en donde el anticuerpo o fragmento son capaces de disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC).
2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen al polipéptido del SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativos en los que la extensión axonal sería beneficiosa en un mamífero, en donde el anticuerpo o fragmento son capaces de disminuir la inhibición del crecimiento axonal de una neurona del sistema nervioso central (SNC).
- 10 3. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la esclerosis múltiple.
4. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la ELA.
- 15 5. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la enfermedad de Huntington.
6. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la enfermedad de Alzheimer.
7. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la enfermedad de Parkinson.
- 20 8. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son la neuropatía diabética.
9. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son el ictus.
- 25 10. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son una lesión cerebral traumática.
11. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativos son una lesión de la médula espinal.

FIG. 1

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGCGCGCCCGA
 GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAG
 CCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC
 TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCGCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCAGGA
 CCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGCATC
 CCCACCGAGACGCGCTGCTGGACCTAGGCAAGAACC GCATCAAAACGCTCA
 ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA
 GAACATCGTGAGCGCGCTGGAGCCCGGCCCTTCAACAACCTCTTCAACCTC
 CGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCT
 TCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT
 TATCCTACTGGAGTATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG
 TTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCTCAAC
 AGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCG
 AGGCGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCTGAGGCTCCGGCACCTCAA
 CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT
 TGGAGATCTCCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTAC
 GGCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC
 CTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCCTACA
 ACCCATCAGCACCATTTGAGGCTCCATGTTGATGAGCTGCTCCGGCTGCA
 GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTC
 CGCGGCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCA
 CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCT
 GGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTCCGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCC
 GCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCCGAGTT
 TGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCAACTACT
 TCACTGCCGCGCGCCGATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGT
 GGACGAGGGCCACACGCTGCAAGTTTGTGTGCCGGGCGGATGGCGACCCGCCG
 CCGCCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA
 ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCA
 GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAA
 CGACTCCATGCCCGGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCC
 ATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGA
 GGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCTTTCGACATCAAGACCTCA
 TCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTCCCTGGGCGTCTCTCTTCTGOC
 TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAAT
 CGAGATCGAGTATGTGCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGAC
 GCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGCAG
 GGACCCCCGCGCGCCGGGCAGGGGAAGGGGCTGGCCGCCACCTGCTCACT
 CTCAGTCTTCCACCTCCTCCCTACCCCTTCTACACACGTTCTCTTTCTCCCT
 CCGGCTCCGTCCCCTGCTGCCCGCCAGCCCTCACCACCTGCCCTCCTTC
 TACCAGGACCTCAGAAGCCAGACCTGGGGACCCACCTACACAGGGGCATT
 GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACACGCGGCAGAGTCAATAAT
 TCAATAAAAAAGTTACGAACCTTCTCTGTAACCTGGGTTTCAATAATTATGGA
 TTTTATGAAAACCTGAAATAATAAAAAAGAGAAAAAACTATTTCTATAGC

FIG. 1 (continuación)

TAGTCGGAATGCAAACTTTTGACGTCCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCCAAC
 TCAGTTTCTTGTTTTTCTCTTCNTCCTNCTCCTCTTCTTCTCCTTTCTCTTCTCT
 TCCCCAGTG GGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC
 CCACCCACCTGCCCACCCCGCCCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC
 AGGCCTGGGCCCAGCTCCGGGCTGGCTTTTTCAGGGCGCAGGTGGAAGGGGA
 CAGGTCTGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC
 ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG
 CTGGGGTCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG
 AGGTGGGGCCCCACCCAGCCTCTGGTCCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT
 GGGCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCCTCAGTCTCCACATCTGTAC
 AAATGGGAACATTACCCCTGCCCTGCCTACCTNANAGGGCTGTTNTGAGGN
 ATNGATGAGATGATGTATGT

FIG. 2

MLAGGVRSMPSPLLACWQPIILLVLGSLV
 SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFA
 VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF
 PHLEELELNENIVSAVEPGAFFNNLFNLRTL
 GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI
 VILLDYMFDLYNLKSLEVGDNDLVYISHR
 AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSTPTEALSHLH
 GLIVLRRLRHLNINAIIRDYSFKRLYRLKVLEI
 SHWPYLDTMTNCLYGLNLTSLSTHCHNL
 AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM
 LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNY
 LRVLNVSGNQLTTLLEESVFHSGVGNLETIL
 DSNPLACDCRLLWVFRRRWRNLNFRQQPT
 CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRRRA
 RIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRADGDPP
 PAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFPDGTLE
 VRYAQVQDNGTYLCIAANAGGNDSPPAHL
 HVRSYSPDWPHQPNKTFAFISNQPGEGEA
 NSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVV
 LFCLVLLFLWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKS
 DAGISSADAPRKFNMKMI

FIG. 3

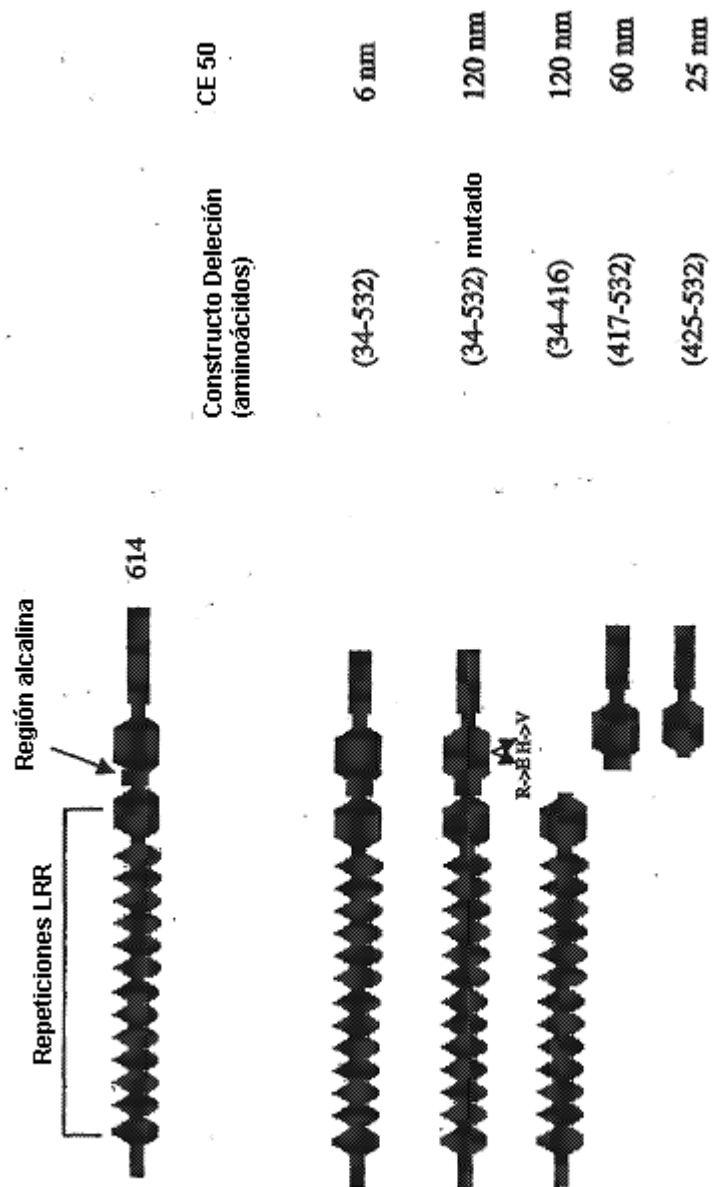


FIG. 4

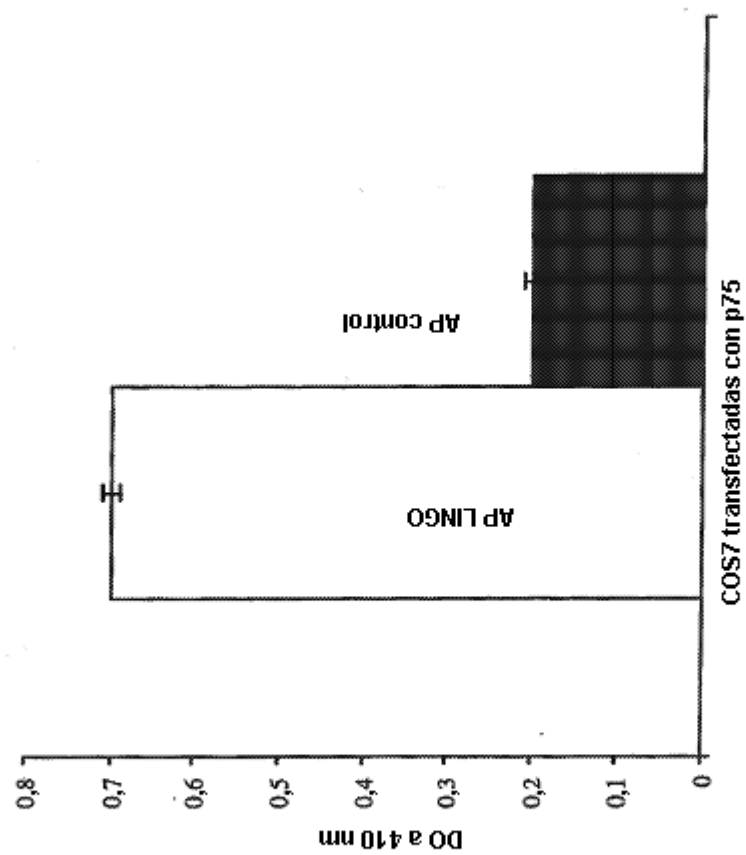


FIG. 5

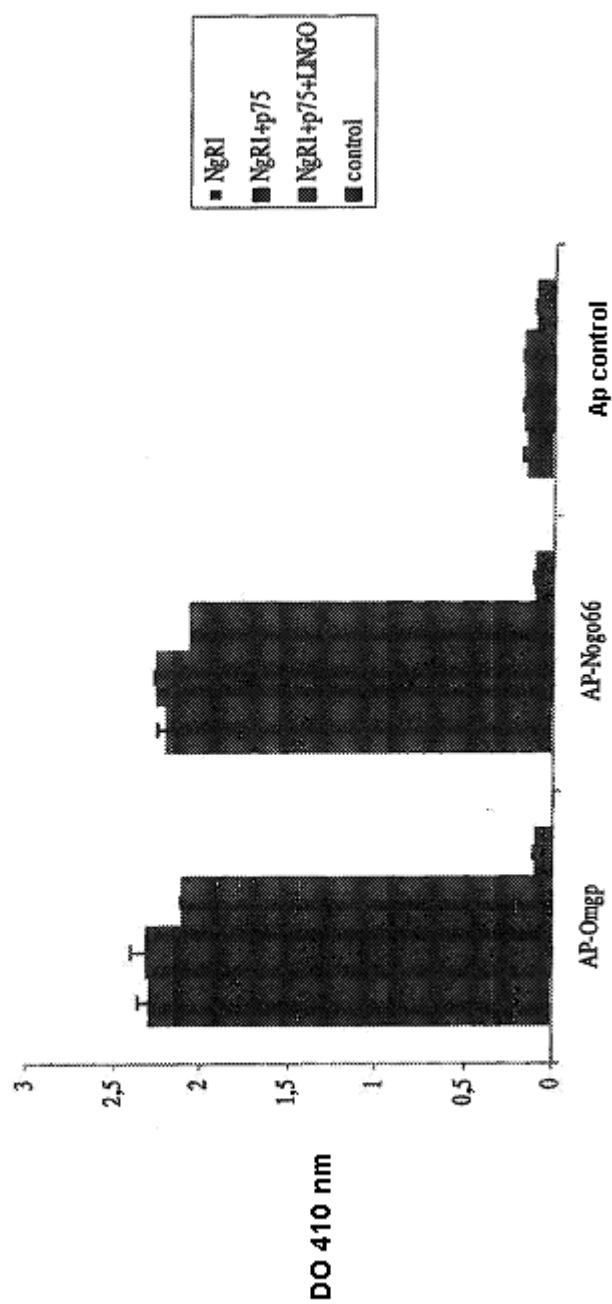


FIG. 6

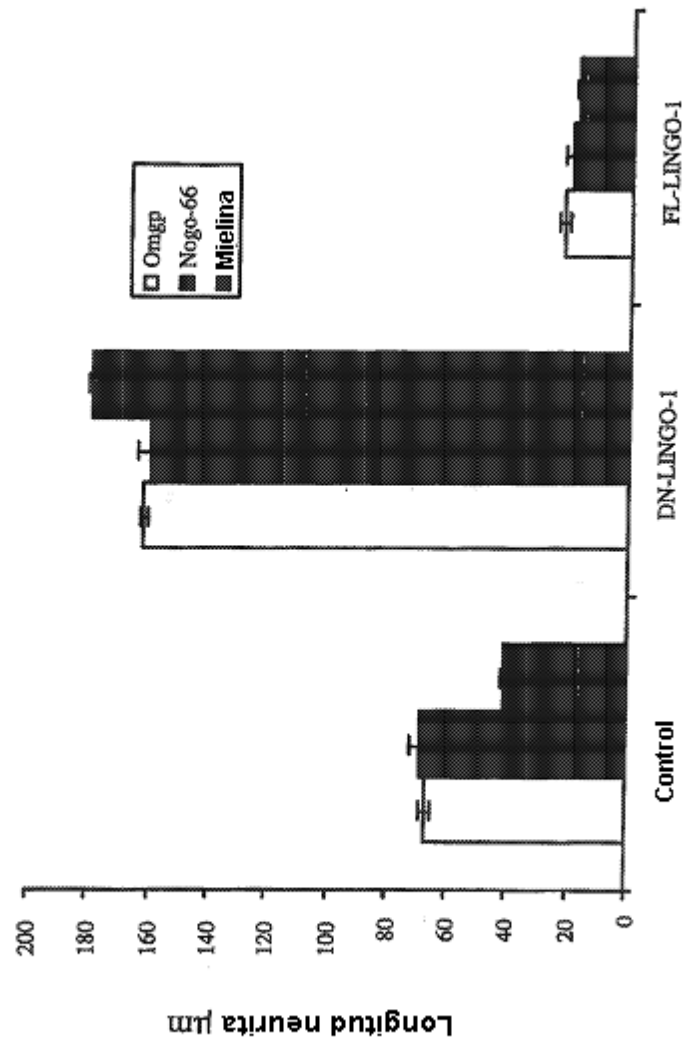


FIG. 7

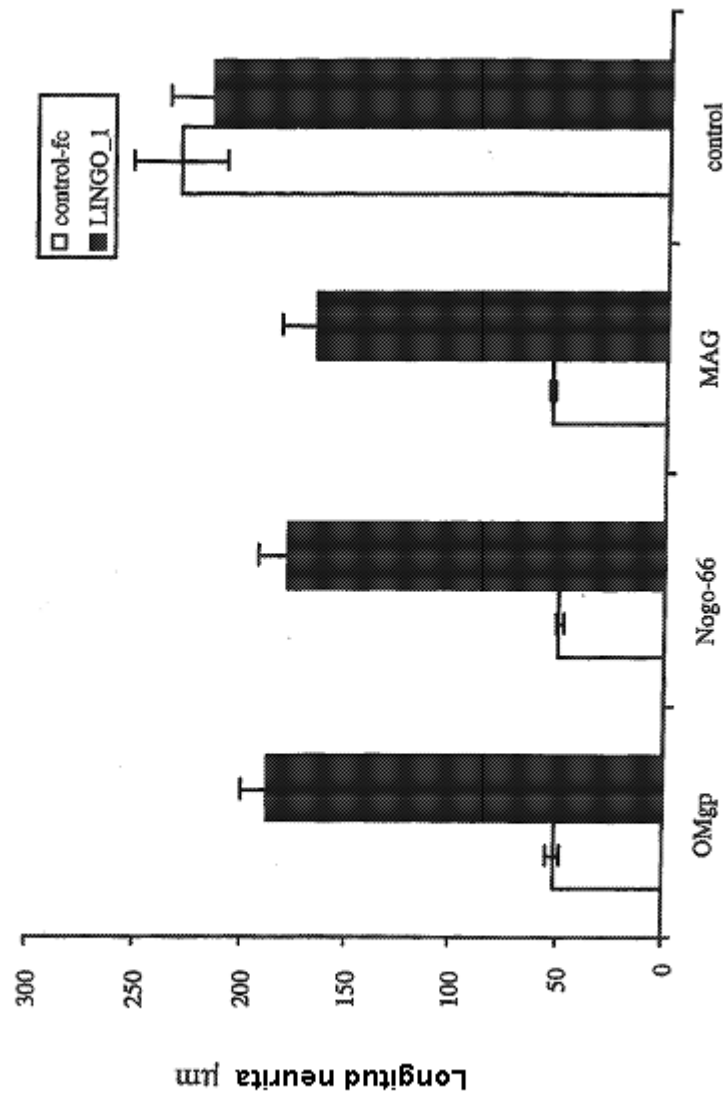


FIG. 9

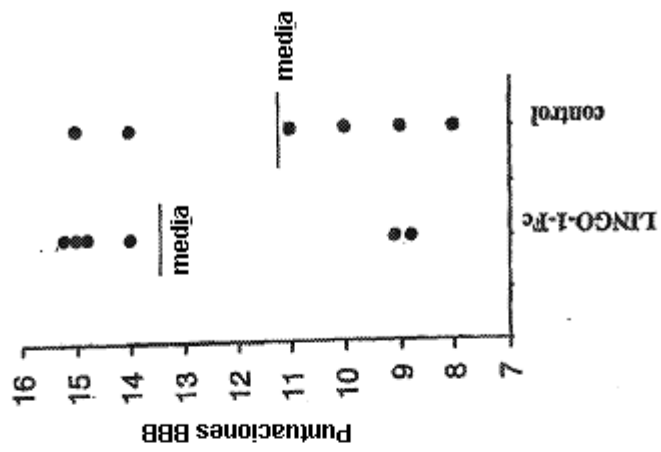


FIG. 8

