

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 501**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006 E 06805972 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1928905**

54 Título: **Dominios de unión de proteínas de la familia de proteínas de moléculas de orientación repulsiva (RGM) y fragmentos funcionales de las mismas, así como su uso**

30 Prioridad:

30.09.2005 EP 05021451

01.10.2005 US 722565 P

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

06.08.2015

73 Titular/es:

ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG
(100.0%)

Max-Planck-Ring 2a
65205 Wiesbaden, DE

72 Inventor/es:

MÜLLER, BERNHARD, K.;
SCHAFFAR, GREGOR y
MUELLER, REINHOLD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 542 501 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

Dominios de unión de proteínas de la familia de proteínas de moléculas de orientación repulsiva (RGM) y fragmentos funcionales de las mismas, así como su uso

La presente invención se refiere a la identificación y uso de dominios de unión a receptor de miembros de la familia de proteínas de moléculas de orientación repulsiva (RGM), así como a fragmentos de polipéptidos derivados de las mismas. Los dominios o fragmentos de péptidos según la invención son adecuados como agentes para la inmunización activa o pasiva de individuos, además de como agentes diagnósticos y terapéuticos para su uso en enfermedades o estados de enfermedad en los que participa la formación o desarrollo de un miembro de la familia de RGM y un receptor celular asociado a esta molécula. La invención se refiere además a anticuerpos monoclonales y policlonales contra los dominios de unión según la invención y contra los polipéptidos derivados de los mismos, así como a procedimientos para la preparación de los dominios, polipéptidos y anticuerpos según la invención.

Estado de la técnica

La función de los miembros de la familia de proteínas de RGM se describió por primera vez por Monnier, P.P. et al., Nature, 419, p392-395, 2002. Esta familia comprende tres miembros conocidos hasta la fecha que se designan RGM A, RGM B (también designado DRAGON) y RGM C (también designado hemojuvelina) (Niederkofler V. et al. J. Neurosci. 24, 808-18, 2004). A este respecto, se trata de glucoproteínas que están unidas mediante un anclaje de lípido (anclaje de glicosilfosfatidilinositol = anclaje de GPI) a la membrana plasmática. Los miembros de esta familia de proteínas no presentan una amplia homología de secuencias con otras proteínas y como características estructurales se han identificado esencialmente las siguientes regiones: un péptido señal del extremo N; una secuencia de RGD; un sitio de escisión proteolítica para la secuencia de aminoácidos GDPH; un homólogo estructural del dominio del factor de von Willebrand (vWF D); una secuencia hidrófoba en la proximidad del extremo C y un anclaje del extremo C de la secuencia consenso de GPI (véase también la Figura 2).

En seres humanos, las secuencias codificantes para RGM A están localizadas en el cromosoma 15, para RGM B en el cromosoma 5 y para RGM C en el cromosoma 1. Debe observarse un patrón de expresión característico: RGM A y B se expresan especialmente en cerebro adulto y médula espinal, RGM C se expresa especialmente en músculo esquelético, hígado y músculo cardíaco, y RGM B además en tejido cartilaginoso.

Las proteínas RGM se identificaron originariamente como proteínas candidatas a desempeñar una función importante en la formación de proyecciones neuronales topográficas (Stahl B. et al., Neuron 5:p 735-43, 1990; Mueller B.K. et al., Curr. Biol. 6, p. 1497-1502, 1996; Mueller BK en Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, editado por H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215-229, 1997). Su capacidad para surtir efecto repelente (repulsivo) o bloqueante (inhibidor) sobre células nerviosas en crecimiento fue una característica funcional decisiva que desempeñó una función importante en su aislamiento, clonación y caracterización. En sistemas de ensayo celular sencillos, la actividad era bien detectable. En dos ensayos celulares diferentes, las proteínas RGM surten efecto bloqueante o repulsivo. En la prueba de colapso se añaden proteínas RGM a fibras nerviosas en crecimiento. La unión de RGM y el receptor de RGM desencadenan una intensa reacción en la que se insertan todos los elementos membranosos del cono de crecimiento neuronal. A este respecto, el cono de crecimiento similar a una mano originalmente extendido se convierte en un hilo delgado. En presencia de RGM, las fibras nerviosas siguen bloqueadas, se repliegan fuertemente hacia atrás y ya no pueden continuar más su crecimiento.

Las proteínas RGM ejercen una parte de su acción mediante la unión al receptor de RGM neogenina (Rajagopalan S. et al., Nat Cell Biol. 6 p,756-62, 2004). La neogenina está muy relacionada con el receptor de DCC (Delecionado en Cáncer Colorrectal). Ambos receptores son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y poseen un dominio extracelular, uno transmembranario y uno intracelular. Ambos se describieron como receptores para otro ligando, la netrina-1, pero solo la neogenina, pero no DCC, se une a proteínas RGM. Los dominios extracelulares de estos receptores están constituidos por 4 dominios similares a inmunoglobulina a los que siguen los 6 dominios de repetición de fibronectina.

Lo que mejor se entiende es la función de RGM A en el sistema nervioso y es especialmente sorprendente su acción en inhibir el crecimiento de fibras nerviosas a las concentraciones más bajas. Una lesión del sistema nervioso central en seres humanos adultos y en ratas adultas conduce a una acumulación de proteínas RGM en el sitio de lesión (Schwab J.M. et al., Arch. Neurol. En prensa, 2005; Schwab J.M. et al., Eur. J. Neurosci. 21 :p. 387-98, 2005). De esta manera se evita el nuevo crecimiento de las fibras nerviosas dañadas y se producen pérdidas de función permanentes más o menos graves en función del lugar del sitio de la lesión. Esta actividad inhibitoria para el crecimiento de fibras nerviosas de RGM media en la unión al receptor neogenina (Rajagopalan S. et al., en el lugar indicado). El mismo receptor media en la unión de netrina-1, pero también una acción contraria que estimula el crecimiento de fibras nerviosas.

Los resultados más recientes indican que las proteínas RGM también cumplen objetivos importantes en el sistema nervioso central y periférico (Matsunaga Eiji et al., Nature Cell Biology, 6, p. 749-55, 2004; Matsunaga Eiji et al.,

Development, Growth & Differentiation, 46, p. 481-6, 2004), en la regulación del metabolismo del hierro (documento WO 2004/092405), en enfermedades tumorales, en procesos inflamatorios y en la formación de huesos y tejido cartilaginoso. El documento WO 03/089608 describe métodos y composiciones de proteínas para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades del sistema nervioso central, de la retina, de la piel o de la musculatura con una proteína de la familia que también se designa DRAGON (proteínas RGM). El documento WO 00/73801 describe un método para el diagnóstico de una enfermedad en la que se expresa un antígeno asociado a cáncer humano codificado por ácido nucleico. El documento WO 02/051438 describe el uso de un modulador de un polipéptido RGM o de un fragmento funcional o derivado del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis, alivio o tratamiento de enfermedades o estados que están asociados a la degeneración o lesión de tejido nervioso de vertebrados.

Debido a la observación de que RGM A, B y C se unen con alta afinidad al receptor de neogenina, el objetivo de la presente invención consistió en caracterizar en detalle dominios de unión funcionales de estas moléculas, especialmente de RGM A. Esto haría posible generar anticuerpos contra los dominios o contra péptidos activos derivados de los mismos que neutralizan con alta probabilidad la actividad inhibitoria de RGM y que de esta manera podrían estimular la regeneración o un nuevo crecimiento de fibras nerviosas. Además, podrían proporcionarse dominios de unión o péptidos RGM activos derivados de los mismos como agentes en sí terapéuticamente eficaces.

Breve descripción de la invención

El objetivo anterior se resolvió sorprendentemente mediante el aislamiento y caracterización de los dominios de unión de proteínas RGM humanas, especialmente RGM A, y fragmentos activos de polipéptidos de las mismas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el alineamiento de secuencias de las formas humanas de RGM A (GenBank # NP_064596.1) RGM B (GenBank # NP_001012779) y RGM C (GenBank # NP_998818.1).

La Figura 2 muestra en representación esquemática la síntesis de moléculas de RGM. Entre el péptido señal del extremo N y el anclaje de GPI del extremo C están representados la secuencia de RGD, los dominios del factor de von Willebrand (vWF D), así como una secuencia hidrófoba en la zona del extremo C antes de la región de anclaje. Entre vWFD y la región hidrófoba se supone la zona de dominios de unión de interés según la invención. Debajo del diagrama están las posiciones de aminoácidos correspondientes para RGM A humana, los sitios de escisión proteolítica entre los aminoácidos 168 y 169.

La Figura 3A muestra mediante fotografías de microscopía de fluorescencia la influencia de distintos fragmentos de péptidos RGM A sobre el crecimiento de fibras nerviosas de células neuronales de rata. Mientras que el péptido 1 muestra actividad inhibitoria a una concentración de 10 µg/ml, el péptido 4 es inactivo a la misma concentración. Se representan conjuntos de control correspondientes con tampón o PBS para comparación. La Figura 3B muestra un diagrama de barras de los índices de crecimiento de neuronas determinados (una masa para la superficie cubierta por neuronas en relación con el tamaño del agregado de células; se muestra el valor medio y la desviación estándar) para ilustrar la dependencia de la concentración de la actividad inhibitoria del crecimiento de neuronas del péptido 1 de RGM-A según la invención. El diagrama de barras correspondiente para el péptido 4 de RGM-A se muestra en la Figura 3C.

En la Figura 4A se representan fotografías de microscopía de fluorescencia de células NTERA neuronales humanas que ilustran la influencia del péptido 1 y péptido 4 de RGM-A (respectivamente a una concentración de 30 µg/ml) sobre el crecimiento de fibras nerviosas de estas células. Al igual que la comparación con la fotografía de control también representada (incubación con PBS en lugar de péptido), el péptido 1 provoca exclusivamente una inhibición del crecimiento de fibras nerviosas. En la Figura 4B se representan los índices de crecimiento de neuronas correspondientemente determinados para la serie de experimentos con el péptido 1, péptido 4 y control (PBS) (diagrama superior: mediciones individuales y valor medio, diagrama inferior: diagrama de barras con valor medio y desviación estándar).

La Figura 5A muestra los resultados de un análisis de fragmentos de RGM A en la prueba de crecimiento de fibras NTERA. Los dos fragmentos de RGM A 2 (218 - 284) y 6 (168 - 422) se añadieron a neuronas NTERA a una concentración de 90 nM. Ambos fragmentos inhiben fuertemente el crecimiento de fibras nerviosas de las neuronas NTERA. ***= $p < 0,001$ Significación en comparación con control de PBS.

La Figura 5B muestra fotografías de microscopía de fluorescencia de los resultados de las pruebas de fragmentos de RGM A en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas NTERA. Los fragmentos de RGM A 2 (218 - 284), 3 (266 - 335), 4 (316-386) y 6 (168 - 422) se pipetearon a neuronas NTERA a las concentraciones especificadas. Los fragmentos 2, 3 y 6 fueron activos, es decir, inhibidores del crecimiento de neuronas, el fragmento 4 fue inactivo.

La Figura 5C muestra otros resultados de los análisis de fragmentos de RGM A en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas NTera. Los dos fragmentos de RGM A 3 (286 - 335) y 6 (168 - 422) se añadieron a neuronas NTera a una concentración de 6 µg/ml. Ambos fragmentos inhiben fuertemente el crecimiento de fibras nerviosas de las neuronas NTera. ** = $p < 0,01$ Significación en comparación con control de tampón, *** = $p < 0,001$ Significación en comparación con control de tampón

La Figura 6A muestra el resultado del análisis del péptido 1 de RGM A y dos péptidos que se solapan con él parcialmente (Down-1 y Up-1) en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas NTera. Los péptidos se añadieron a los agregados de NTera a una concentración de 10 µg/ml o 30 µg/ml. 24 - 36 horas después, los cultivos se fijaron, se tiñeron y se evaluaron. A una concentración de 30 µg/ml, los 3 péptidos de RGM A fueron activos e inhibieron significativamente el crecimiento de fibras nerviosas.

La Figura 6B muestra el resultado del análisis de otros tres péptidos de RGM A en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas NTera. Los péptidos de RGM A se añadieron a los agregados de NTera a una concentración de 10 µg/ml o 30 µg/ml. 24 - 36 horas después, los cultivos se fijaron, se tiñeron y se evaluaron. A una concentración de 10 µg/ml, los 3 péptidos de RGM A (5-Ak, 6-Ak, 7-Ak) fueron inactivos; solo los péptidos 7-Ak y 6-Ak mostraron a la mayor concentración una clara tendencia en dirección a la inhibición del crecimiento de fibras nerviosas.

La Figura 7A muestra el resultado de la prueba de unión de RGM A - neogenina. En esta prueba, los anticuerpos policlonales, que se dirigen contra el péptido Down-1, fueron muy potentes y bloquearon a las concentraciones más bajas (Down 1 8641 y Down 1 8640) la interacción del ligando de RGM A con su receptor, la proteína neogenina. Un anticuerpo de control (control de ratón) no tuvo ningún efecto, mientras que un anticuerpo policlonal que puede obtenerse comercialmente de la empresa R & D Systems (PAB anti RGM) también bloqueó la interacción RGM A - neogenina, pero esencialmente menos eficazmente.

La Figura 7B muestra cómo el anticuerpo policlonal específico para Down-1 neutralizó la actividad inhibitoria del potente fragmento 2 de RGM A en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas NTera. Los cultivos de NTera se trataron en la prueba de crecimiento con PBS, fragmento 2 (2 µg/ml) o con fragmento 2 (2 µg/ml) y al mismo tiempo con anticuerpo policlonal Down-1 (0,6 µg/ml).

Descripción detallada de la invención

I. Explicaciones de término generales

“Receptores” designa en el marco de la presente invención especialmente a moléculas superficiales unidas a una membrana celular que pueden interactuar con un ligando, por ejemplo soluble, y como consecuencia de esta interacción pueden desencadenar una señal, por ejemplo, dirigida al interior de la célula o una cascada de señales (también denominado señalización).

“Ligando” designa un componente de unión de bajo o de alto peso molecular natural, es decir, formado *in vivo* o generado artificialmente, para un “receptor”. El ligando puede moverse libremente preferiblemente en el entorno extracelular.

“Inmunogén” designa un fragmento de péptido según la invención en forma glucosilada o no glucosilada que es adecuado para la inducción de la formación de anticuerpos contra el inmunogén. Dado el caso, puede ser ventajosa una unión del inmunogén (como hapteno) a un vehículo macromolecular.

“Epítipo” o determinante antigénico designa la zona de un antígeno que determina la especificidad de un anticuerpo como, por ejemplo, de una proteína. Si este epítipo se forma de nuevo en una sección de la proteína, por ejemplo, mediante influencias externas, como, por ejemplo, una interacción de una proteína con un ligando, o se expresa sobre la superficie de la molécula accesible, entonces se habla de un “neopítipo”.

“Dominio” de una proteína o anticuerpo designa una estructura compleja formada por elementos de hélice alfa y/u hoja plegada beta limitada dentro de la proteína.

Si no se hacen otras indicaciones, entonces el término “proteína de RGM según la invención” comprende tanto el dominio de unión a neogenina como también los péptidos derivados del mismo de un miembro de la familia de moléculas de RGM, especialmente RGM A, B y C, en el alcance de las reivindicaciones. Especialmente también están comprendidos polipéptidos “inhibitoriamente activos” funcionales.

Polipéptidos “inhibidores” o “inhibitoriamente activos” son aquellos que reducen o inhiben completamente el crecimiento de células nerviosas en una prueba de crecimiento de células nerviosas descrita en el presente documento.

Si no se hacen otras indicaciones, entonces “RGM” representa RGM A, B y C, especialmente RGM A.

“Neogenina” o “receptor de neogenina” son términos sinónimos.

II. Objetos especiales de la invención

- 5 Un primer objeto de la invención se refiere a dominios de unión al receptor de neogenina de la molécula de orientación repulsiva (RGM) en forma glucosilada o especialmente no glucosilada, derivados de RGM de seres humanos según la reivindicación 1.

- 10 Una forma de realización se refiere a los dominios de unión al receptor de neogenina especificados en la reivindicación 2, derivados de una RGM A humana según SEC ID N°: 2, RGM B humana según SEC ID N°:4 o RGM C humana según SEC ID N°: 6. A este respecto, los dominios de unión comprenden especialmente una secuencia de aminoácidos con una longitud de hasta 150, como, por ejemplo, hasta 125, hasta 100, hasta 80, hasta 30, o hasta 20, como, por ejemplo, 10 a 20, como, por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 restos de aminoácidos contiguos de una región de la secuencia de aminoácidos de RGM y concretamente del extremo C con respecto al
15 sitio de corte de RGD y del extremo N con respecto a la región de anclaje de GPI de RGM, como especialmente RGM A.

Como ejemplos concretos pueden mencionarse:

- 20 GQHVEIQAKYIGTTIVVRQ (SEC ID N°: 8)
GHYVEMHARYIGTTVFVRQ (SEC ID N°: 9)
GNHVEIQAAAYIGTTIIIRQ (SEC ID N°: 10)

- 25 Ejemplos de dominios de unión al receptor de neogenina comprenden una secuencia de aminoácidos de la posición de aminoácidos 200-350 según SEC ID N°: 2 o fragmentos de unión al receptor de neogenina funcionales de la misma. Aquellos dominios o fragmentos comprenden especialmente:

- 30 las posiciones de aminoácidos 200-325, 200-300, 200-285, 250-285 ó 260-285 ó 260-280 o los fragmentos 215-340, 260-340, 250-300, 260-291, 210-260 ó 290-350 según SEC ID N°: 2.

Otros ejemplos concretos de dominios de unión adecuados según la invención son:

- 35 KITEKVSGQHVEIQAKYIGTTIWRQVGRYLT (SEC ID N°: 23) derivado de RGM A;
RIVERESGHYVEMHARYIGTTVFVRQVGRYLT (SEC ID N°: 24) derivado de RGM B;
SIQTANPGNHVEIQAAAYIGTTIIIRQTAGQLS (SEC ID N°: 25) derivado de RGM C.
KITEKVSGQHVEIQAK (SEC ID N°: 26) derivado de RGM A;
YIGTTIVVRQVGRYLT (SEC ID N°: 27) derivado de RGM A;
WNAVEDWDSQGLYLC (SEC ID N°: 28) derivado de RGM A;
TIIFKNFQECVDQKVYQA (SEC ID N°: 29) derivado de RGM A;
40 RIVERESGHYVEMHAR (SEC ID N°: 31) derivado de RGM B;
YIGTTVFVRQVGRYLT (SEC ID N°: 32) derivado de RGM B;
SIQTANPGNHVEIQAA (SEC ID N°: 33) derivado de RGM C; y
YIGTTIIIRQTAGQLS (SEC ID N°: 34) derivado de RGM C.

- 45 Otros ejemplos de dominios de unión al receptor de neogenina o fragmentos de unión de los mismos comprenden por lo menos 10, como, por ejemplo, 10-30, 10-25, 10-20 ó 10-15, como especialmente 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, restos de aminoácidos contiguos de uno de los péptidos anteriormente mencionados o de la zona de secuencia de la posición 260 a 291 ó 267 a 285 según SEC ID N°: 2, de la zona de secuencia de la posición 260 a 325 según SEC ID N°: 4 o de la zona de secuencia de la posición 250 a 300 según SEC ID N°: 6.

- 50 Otro objeto de la invención se refiere a fragmentos de polipéptidos antigénicos de los dominios de unión al receptor de neogenina según la definición anterior. Especialmente son objeto de la invención aquellos fragmentos de polipéptidos antigénicos que son útiles para la preparación de moléculas de inmunoglobulina y modulan la unión de RGM al receptor de neogenina, especialmente antagonizan parcialmente o completamente. Por ejemplo, son de
55 mencionar aquellos fragmentos de polipéptidos antigénicos que comprenden por lo menos 10, como, por ejemplo, 10-30, 10-25, 10-20 ó 10-15, como especialmente 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, restos de aminoácidos contiguos de un péptido según SEC ID N°: 7, 8, 9, 10, 23 a 29 ó 31 a 34.

- 60 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o de un fragmento de polipéptido según la definición anterior para la preparación de un antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal contra RGM, modulando el antisuero o el anticuerpo especialmente la unión de RGM al receptor de neogenina, preferiblemente antagonizándola parcialmente o completamente.

- 65 También son objeto de la invención aquellos antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales contra RGM según la definición anterior para su uso en el diagnóstico o terapia.

También es objeto de la invención el uso de un antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal según la invención para la preparación de un producto farmacéutico para el diagnóstico o terapia de enfermedades o estadios de enfermedad, que están mediados por una interacción del receptor de neogenina con RGM o un fragmento de RGM. Estas enfermedades o estadios de enfermedad se eligen especialmente de entre:

- a) lesiones mecánicas del cráneo, cerebro y médula espinal,
- b) enfermedades crónicas, como enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias y autoinmunitarias,
- c) trastornos de la regeneración neuronal, del brote axónico, de la extensión de neuronas y de la plasticidad neuronal,
- d) enfermedades tumorales y metastatización tumoral

Además, es objeto de la invención el uso de un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o de un fragmento de polipéptido según la definición anterior para la preparación de un producto para el diagnóstico o terapia de enfermedades o estadios de enfermedad que están mediados por una interacción alterada de RGM o un fragmento de RGM con el receptor correspondiente (como, por ejemplo, el receptor de neogenina). Estas enfermedades o estadios de enfermedad se eligen especialmente de entre:

- a) procesos de neuritogénesis modificados en enfermedades psicóticas y estados de dolor crónico que son provocados por la excesiva formación de brotes de neuronas y/o sinaptogénesis patológica
- b) enfermedades asociadas a un metabolismo del hierro alterado, especialmente hemocromatosis juvenil
- c) enfermedades asociadas a un crecimiento óseo alterado
- d) enfermedades asociadas a modificaciones degenerativas del cartílago
- e) enfermedades asociadas a lesiones discales y de los cuerpos vertebrales
- f) enfermedades asociadas a procesos de migración celular desregulados incontrolados.

Otro objeto de la invención se refiere al dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o a un fragmento de polipéptido según la definición anterior para su uso como diana para la detección o para la identificación de ligando de unión a RGM.

Otro objeto de la invención se refiere al dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o a un fragmento de polipéptido según la definición anterior para su uso como inmunogén para inmunización activa o pasiva.

También son objeto de la invención antisueros policlonales que pueden obtenerse mediante la inmunización de un mamífero con una cantidad antigénica de un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o de un fragmento de polipéptido según la definición anterior; así como anticuerpos monoclonales contra un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o contra un fragmento de polipéptido según la definición anterior, así como fragmentos de unión al antígeno del mismo, dado el caso en forma humanizada.

También son objeto de la invención productos farmacéuticos que comprenden en un vehículo farmacéuticamente compatible por lo menos un constituyente activo seleccionado de entre:

- a) un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o un fragmento de polipéptido según la definición anterior o
- b) anticuerpos monoclonales o policlonales según la definición anterior.

Aquellos productos farmacéuticos sirven especialmente para administración intratecal, intravenosa, subcutánea, oral o parenteral, nasal y por inhalación.

Además, es objeto de la invención un vector de expresión que comprende por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o un fragmento de polipéptido según la definición anterior, operativamente ligado a por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos reguladora.

Además, la invención se refiere a:

- Microorganismos recombinantes que llevan por lo menos un vector según la definición anterior.
- Líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal según la definición anterior.
- Procedimientos para la preparación de un dominio de unión al receptor de neogenina según la definición anterior o de un fragmento de polipéptido según la definición anterior, en los que se cultiva un microorganismo recombinante según la definición anterior y el producto de proteína producido se aísla del cultivo. A este respecto, una línea celular de hibridoma se cultiva según la definición anterior y el producto de proteína producido se aísla del cultivo.

III. Otras indicaciones para la realización de la invención

1. Polipéptidos

- 5 Son objeto de la invención especialmente los dominios de unión de proteínas de la familia de RGM especificados en las reivindicaciones 1 y 2 y fragmentos de péptidos derivados de estos dominios. Aunque según la invención se investigaron especialmente RGM A y su dominio de unión y fragmentos derivados de éste, también son objeto de la invención dominios y fragmentos correspondientes de proteínas homólogas, como especialmente miembros homólogos de la familia de RGM, como especialmente RGM B y RGM C.

- 10 “Equivalentes funcionales” o análogos de los dominios de RGM concretamente dados a conocer o polipéptidos son polipéptidos distintos de éstos en el marco de la presente invención como, por ejemplo, aquellos con un grado de homología de menos del 100 % y por lo menos 75 % con respecto a los dominios de unión a neogenina de proteínas según SEC ID N°: 2, 4 ó 6, pero que además poseen la actividad biológica deseada. Éstos estarán especialmente
15 capacitados para la unión al receptor de neogenina y/o en una prueba de crecimiento de fibras nerviosas descrita en el presente documento muestran un efecto inhibitor y a este respecto inhiben parcial o completamente, estadísticamente significativamente ($p \leq 0,05$), el crecimiento de fibras nerviosas.

- 20 Por “equivalentes funcionales” se entiende según la invención especialmente mutantes que presentan en por lo menos una de las posiciones de secuencia de las secuencias concretas anteriormente mencionadas un aminoácido distinto al concretamente mencionado, pero aún así poseen una de las actividades biológicas mencionadas en el presente documento. Los “equivalentes funcionales” comprenden, por tanto, los mutantes que pueden obtenerse mediante una o varias adiciones, sustituciones, delecciones y/o inversiones de aminoácidos, pudiendo aparecer las modificaciones mencionadas en cualquier posición de secuencia, en tanto que conduzcan a un mutante con el perfil
25 de propiedades según la invención. La equivalencia funcional también se da especialmente cuando coinciden cualitativamente los patrones de reactividad entre el mutante y el polipéptido sin modificar, es decir, por ejemplo, los mismos efectos biológicos solo pueden observarse de manera muy desigual. Ejemplos de sustituciones adecuadas de restos de aminoácidos son las siguientes:

Resto original	Ejemplos de la sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

- 30 “Equivalentes funcionales” en el sentido anterior también son precursores de los polipéptidos descritos, así como derivados funcionales y sales de los polipéptidos. Por el término “sales” se entiende tanto sales de grupos carboxilo como también sales de adición de ácido de grupos amino de las moléculas de proteína según la invención. Las sales de grupos carboxilo pueden prepararse de forma en sí conocida y comprenden sales inorgánicas, como, por
35 ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro y cinc, así como sales con bases orgánicas, como, por ejemplo, aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. También son objeto de la invención sales de adición de ácido, como, por ejemplo, sales con ácidos minerales, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico. Los “derivados funcionales” de polipéptidos según la invención también pueden prepararse con ayuda de técnicas conocidas de grupos laterales de aminoácidos funcionales o de
40 sus extremos N o C. Los derivados de este tipo comprenden, por ejemplo, ésteres alifáticos de grupos de ácido carboxílico, amidas de grupos de ácido carboxílico, que pueden obtenerse mediante reacción con amoniaco o con una amina primaria o secundaria; grupos amino libres de derivados de N-acilo, preparados mediante reacción con grupos acilo; o grupos hidroxilo libres de derivados de O-acilo preparados mediante reacción con grupos acilo.
- 45 Los “equivalentes funcionales” también comprenden naturalmente polipéptidos que son accesibles de otros organismos, así como variantes que se producen naturalmente. Por ejemplo, pueden constatarse zonas de regiones

de secuencias homólogas mediante comparación de secuencias y determinarse enzimas equivalentes según las especificaciones concretas de la invención.

- 5 Los "equivalentes funcionales" son además proteínas de fusión que presentan una de las secuencias de polipéptidos anteriormente mencionadas o equivalentes funcionales derivados de las mismas y por lo menos otra secuencia heteróloga funcionalmente distinta de la misma en enlace funcional del extremo N o C (es decir, sin reducción recíproca funcional esencial de las proporciones de proteínas de fusión). Ejemplos no limitantes de secuencias heterólogas de este tipo son, por ejemplo, enzimas e inmunoglobulinas.
- 10 Los "equivalentes funcionales" comprendidos según la invención son homólogos a las proteínas o péptidos concretamente dados a conocer. Éstos poseen por lo menos el 75 % o especialmente por lo menos el 85 %, como, por ejemplo, el 90 %, 95 % o el 99 %, de homología con respecto a una de las secuencias concretamente dadas a conocer, por ejemplo, calculada según el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Una homología en porcentaje de un polipéptido homólogo según la invención significa especialmente la
- 15 identidad en porcentaje de los restos de aminoácidos referida a la longitud total de las secuencias de aminoácidos concretamente descritas en el presente documento.

20 Por una secuencia de aminoácidos "derivada" se entiende según la invención, cuando no se hace ninguna otra indicación, una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 % o al menos el 90 %, especialmente el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y el 99 %, con la secuencia de partida.

25 Por "identidad" entre dos secuencias se entiende la identidad de los restos de aminoácidos a lo largo de la longitud de la secuencia total respectiva, como, por ejemplo, la identidad que se calcula mediante la comparación con ayuda del software Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (EE.UU.) con aplicación del método de Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) ajustando los siguientes parámetros:

Parámetros de múltiples alineamientos:

Penalización por apertura de hueco	10
Penalización por extensión de hueco	10
Intervalo de penalización por separación de huecos	8
Penalización por separación de huecos	desactivada
% de identidad por retraso de la alineación	40
Huecos específicos de residuo	desactivado
Hueco de residuos hidrófilos	desactivado
Peso de la transición	0

30 Parámetros de alineamientos por parejas:

Algoritmo FAST	activado
Tamaño K-tuple	1
Penalización por hueco	3
Tamaño de la ventana	5
Número de las mejores diagonales	5

35 Para la ilustración adicional de los homólogos comprendidos según la invención se remite a la siguiente tabla que muestra la coincidencia en porcentaje de RGM B y C con RGM A para la proteína de longitud completa, así como para determinadas zonas de la secuencia parcial especialmente interesantes según la invención.

	RGM A - RGM B	RGM A - RGMC
Proteínas de longitud completa	51 % ²⁾³⁾	47 %
aa ¹⁾ 200 - 350	62 % ²⁾	55 %
aa 200 - 325	61 %	55 %
aa 200 - 300	66 %	60 %
aa 200 - 285	65 %	66 %
aa 250 - 285	58 %	61 %
aa 260 - 285	57 %	78 %
1) Resto de aminoácido, indicación de la posición referida a la secuencia de RGM A (SEC ID N°: 2)		
2) Identidad de aminoácidos de las proteínas de longitud completa y de los fragmentos de péptidos en porcentaje		
3) Método: BLAST 2 SEQUENCES VERSION BLASTP 2.2.5 [16-Nov-2002]		
Matriz: Blosum62 (apertura de huecos: 11 extensión de huecos: 1)		

En caso de una posible glucosilación de proteínas, los equivalentes según la invención comprenden proteínas del tipo anteriormente designado en forma desglucosilada o glucosilada, así como formas modificadas que pueden obtenerse mediante la modificación del patrón de glucosilación.

- 5 Los homólogos de los péptidos según la invención pueden identificarse mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, como, por ejemplo, mutantes de acortamiento. Por ejemplo, puede generarse una biblioteca variegada de variantes de péptidos mediante mutagénesis combinatoria al nivel del ácido nucleico, como, por ejemplo, mediante ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Hay múltiples procedimientos que pueden usarse para la preparación de bibliotecas de posibles homólogos de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede realizarse en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintetizado puede luego ligarse en un vector de expresión adecuado. El uso de un conjunto de genes degenerado hace posible proporcionar secuencias enteras en una mezcla que codifican el conjunto deseado de posibles secuencias de proteínas. El experto conoce procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477).

2. Ácidos nucleicos

- Además, son objeto de la invención las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos anteriormente descritos, así como secuencias o secuencias parciales de ácidos nucleicos derivadas de los mismos.

- Todas las secuencias de ácidos nucleicos según la invención (secuencias de ADN o ARN mono y bicatenarias, como, por ejemplo, ADNc y ARNm) pueden prepararse de forma en sí conocida mediante síntesis química a partir de las unidades estructurales de nucleótidos como, por ejemplo, mediante la condensación de fragmentos de unidades de ácido nucleico complementarias solapantes individuales de hélice doble. La síntesis química de oligonucleótidos puede realizarse, por ejemplo, de manera conocida, según el método de fosforamido (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press Nueva York, páginas 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de huecos con ayuda del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa y reacciones de ligación, así como procedimientos de clonación generales, se describen en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Por una secuencia de ácidos nucleicos "derivada" se entiende según la invención, cuando no se haga ninguna otra indicación, una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 % o al menos el 90 %, especialmente del 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y el 99 %, con la secuencia de partida.

- Por "identidad" entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos a lo largo de la longitud del ácido nucleico total respectivo, especialmente la identidad que se determina mediante comparación con ayuda del software Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (EE.UU.) con aplicación del método de Clustal (véase anteriormente).

- También son objeto de la invención secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno de los péptidos anteriores y sus equivalentes funcionales que, por ejemplo, son accesibles usando análogos de nucleótidos artificiales.

- La invención se refiere a tanto moléculas de ácido nucleico aisladas, que codifican péptidos según la invención o secciones biológicamente activas de los mismos, así como a fragmentos de ácido nucleico, que pueden usarse, por ejemplo, como sondas de hibridación o cebadores para la identificación o amplificación de los ácidos nucleicos codificantes según la invención.

- Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden además contener secuencias sin traducir del extremo 3' y/o 5' de la zona del gen codificante.

- Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede estar además esencialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se prepara mediante técnicas recombinantes, o estar libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

- Una molécula de ácido nucleico según la invención puede aislarse mediante técnicas estándar de biología molecular y de información de secuencias proporcionada según la invención. Por ejemplo, puede aislarse ADNc de una biblioteca de ADNc adecuada usando una de las secuencias completas concretamente dadas a conocer o una sección de las mismas como sonda de hibridación y técnicas de hibridación estándar (como se describe, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, puede aislarse una molécula de ácido nucleico que comprende una de las secuencias según la invención o una sección de las mismas, mediante reacción en cadena de la polimerasa, usándose los cebadores de oligonucleótidos que se crearon basándose en esta secuencia. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector adecuado y caracterizarse mediante análisis de secuencias de ADN. Los oligonucleótidos según la invención pueden además

prepararse mediante procedimientos de síntesis estándar, por ejemplo, con un sintetizador de ADN automático.

La invención comprende además las moléculas de ácido nucleico complementarias a las secuencias de nucleótidos concretamente descritas o una sección de las mismas.

5 Las secuencias de nucleótidos según la invención hacen posible la generación de sondas y cebadores que pueden utilizarse para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Aquellas sondas o cebadores comprenden habitualmente una zona de la secuencia de nucleótidos que se hibrida, bajo condiciones rigurosas, con al menos aproximadamente 12, preferiblemente al menos aproximadamente 25,
10 como, por ejemplo, aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos sucesivos de una hebra codificante de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención o de una hebra no codificante correspondiente.

Otras secuencias de ácidos nucleicos según la invención se derivan de secuencias codificantes para los dominios y péptidos de RGM según la invención y se diferencian de las mismas mediante la adición, sustitución, inserción o
15 delección de un único nucleótido o varios nucleótidos, pero además codifican péptidos con el perfil de propiedades deseado.

Según la invención, también están comprendidas aquellas secuencias de ácidos nucleicos que comprenden las llamadas mutaciones silenciosas o están modificadas correspondientemente a la utilización de codones de un
20 organismo original o huésped especial, en comparación con una secuencia concretamente mencionada, al igual que variantes que se producen naturalmente, como, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas, de las mismas. Igualmente son objeto secuencias que pueden obtenerse mediante sustituciones de nucleótidos conservativas (es decir, el aminoácido en cuestión se sustituye con un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

25 También es objeto de la invención las moléculas derivadas mediante polimorfismos de secuencias de los ácidos nucleicos concretamente dados a conocer. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variaciones naturales producen normalmente una varianza del 1 al 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

30 Además, la invención también comprende secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con las secuencias codificantes anteriormente mencionadas o son complementarias a ellas. Estos polinucleótidos pueden encontrarse en barridos de bibliotecas genómicas o de ADNc y dado el caso multiplicarse a partir de ellas con cebadores adecuados mediante PCR y aislarse a continuación, por ejemplo, con sondas adecuadas. Otra posibilidad ofrece la transformación de microorganismos adecuados con polinucleótidos o vectores según la invención, la multiplicación
35 de microorganismos y, por tanto, de los polinucleótidos y su posterior aislamiento. Además, los polinucleótidos según la invención también pueden sintetizarse de forma química.

Por la propiedad de poder “hibridar” polinucleótidos se entiende la capacidad de un poli- u oligonucleótido de poder
40 unirse, bajo condiciones rigurosas, a una secuencia casi complementaria, mientras que bajo estas condiciones no tienen lugar uniones inespecíficas entre componentes no complementarios. Para esto las secuencias serán complementarias el 70-100 %, especialmente el 90-100 %, como, por ejemplo, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. La propiedad de poner unir específicamente entre sí secuencias complementarias se aprovecha, por ejemplo, de la técnica de transferencia Northern o Southern o en la unión de cebadores en PCR o RT-PCR. Normalmente se
45 utilizan para esto oligonucleótidos a partir de una longitud de 30 pares de bases. Por condiciones rigurosas se entiende, por ejemplo, en la técnica de la transferencia Northern el uso de una disolución de lavado caliente a 50 – 70 °C, preferiblemente 60 – 65 °C, por ejemplo, 0,1 x tampón SSC con 0,1 % de SDS (20x SSC: NaCl 3 M, citrato de Na 0,3 M, pH 7,0) para la elución de sondas de ADNc inespecíficamente hibridadas o oligonucleótidos. A este respecto, como se ha mencionado arriba, solo permanecen unidos entre sí en gran parte ácidos nucleicos
50 complementarios. El ajuste de las condiciones rigurosas es conocido para el experto y se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Otro aspecto de la invención se refiere a “ácidos nucleicos antisentido”. Éstos comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un “ácido nucleico sentido” codificante. El ácido nucleico antisentido puede ser
55 complementario a la hebra codificante completa o solo a una sección. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una zona no codificante de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos. El término “zona no codificante” se refiere a las secciones de secuencias designadas las zonas sin traducir 5' y 3'.

60 Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido según la invención puede construirse mediante síntesis química y reacciones de ligación enzimática mediante procedimientos conocidos en el área de especialidad. Un ácido nucleico antisentido puede sintetizarse químicamente, usándose nucleótidos que se producen naturalmente o distintos nucleótidos modificados, que están configurados de forma que aumenten la estabilidad biológica de las
65 moléculas, o aumenten la estabilidad física del dúplex, que se forma entre el ácido nucleico antisentido y sentido. Por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de

nucleótidos modificados que pueden usarse para la generación del ácido nucleico antisentido son, entre otros, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. El ácido nucleico antisentido también puede prepararse biológicamente usando un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en la dirección antisentido.

3. Construcciones de expresión y vectores

Son además objeto de la invención construcciones de expresión que contienen, bajo el control genético de secuencias de ácidos nucleicos reguladoras, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína RGM según la invención o equivalente funcional o inmunoglobulina; así como vectores que comprenden por lo menos una de estas construcciones de expresión.

Preferiblemente, aquellas construcciones según la invención comprenden aguas arriba de 5' de la secuencia codificante respectiva un promotor y aguas debajo de 3' una secuencia terminadora, así como dado el caso otros elementos reguladores habituales, y concretamente respectivamente operativamente ligados con la secuencia codificante. Por una "ligación operativa" se entiende la disposición secuencial de promotor, secuencia codificante, terminador y dado el caso otros elementos reguladores de forma que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir convencionalmente su función en la expresión de la secuencia codificante. Ejemplos de secuencias operativamente ligadas son secuencias que eligen diana, así como potenciadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos reguladores comprenden marcadores de selección, señales de amplificación y similares. Secuencias reguladoras adecuadas se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Además de las secuencias de regulación artificiales, todavía puede estar presente la secuencia de regulación natural delante del propio gen estructural. Esta regulación natural puede dado el caso desconectarse mediante modificación genética y aumentarse o reducirse la expresión de los genes. Pero la construcción génica también puede estar construida de forma más sencilla, es decir, no se insertan señales de regulación adicionales antes del gen estructural y no se elimina el promotor natural con su regulación. En lugar de esto, la secuencia de regulación natural se muta de forma que no se realice más regulación y se aumente o reduzca la expresión del gen. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden estar contenidas en una o varias copias en la construcción génica.

Ejemplos de promotores útiles son: promotor cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, lambda-PR o lambda-PL, que encuentran ventajosamente aplicación en bacterias Gram-negativas; así como los promotores Gram-positivos amy y SPO2, los promotores de levadura ADC1, MF-alfa, AC, P-60, CYC1, GAPDH o los promotores de planta CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not o el promotor de ubiquitina o faseolina. Se prefiere especialmente el uso de promotores inducibles, como, por ejemplo, promotores inducibles por luz y especialmente por la temperatura, como el promotor P_{Pr}. Fundamentalmente pueden usarse todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación. Además, también pueden usarse ventajosamente promotores sintéticos.

Las secuencias reguladoras conocidas harán posible la expresión dirigida de las secuencias de ácidos nucleicos y de la expresión de proteínas. Esto puede significar, por ejemplo, dependiendo del organismo huésped, que el gen se expresa o se expresa en exceso solo después de la inducción, o que se expresa y/o se expresa en exceso inmediatamente.

A este respecto, las secuencias reguladoras o factores pueden influir positivamente preferiblemente en la expresión y de esta manera aumentan o disminuyen. Así, puede tener lugar ventajosamente un refuerzo de los elementos reguladores al nivel de la transcripción usándose señales de transcripción fuertes como promotores y/o "potenciadores". Pero además pero también es posible un refuerzo de la traducción mejorándose, por ejemplo, la estabilidad del ARNm.

La preparación de un casete de expresión se realiza mediante la fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos codificante adecuada, así como una señal de terminador o de poliadenilación. Para esto se usan técnicas de recombinación y clonación usuales, como se describen, por ejemplo, en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

La construcción de ácido nucleico recombinante o construcción génica se inserta para la expresión en un organismo huésped adecuado, ventajosamente en un vector específico del huésped que hace posible una expresión óptima del gen en el huésped. Los vectores son perfectamente conocidos para el experto y pueden extraerse, por ejemplo, de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Por vectores también debe entenderse, además de plásmidos, todos aquellos vectores conocidos para el experto como, por ejemplo, fagos, virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, fásmidos, cósmidos y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse autónomamente en el organismo huésped o replicarse cromosómicamente.

Como ejemplos de vectores de expresión adecuados pueden mencionarse:

Vectores de expresión de fusión habituales, como pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), en los que glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A se fusiona con la proteína diana recombinante.

Vectores de expresión no de proteínas de fusión como pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) y pET 11 d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89).

Vector de expresión en levadura para la expresión en la levadura *S. cerevisiae*, como pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123), así como pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vectores y procedimientos para la construcción de vectores que son adecuados para su uso en otros hongos, como hongos filamentosos, comprenden aquellos que se han descrito detalladamente en: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge. Vectores de baculovirus que están disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) comprenden la serie pac (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170:31-39).

Vectores de expresión en plantas, como aquellos que se han descrito detalladamente en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. y Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.

Vectores de expresión en mamífero, como pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195).

Otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas se han descrito en el Capítulo 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

4. Organismos huésped recombinantes

Con ayuda de los vectores según la invención pueden producirse organismos recombinantes que se transforman, por ejemplo, con por lo menos un vector según la invención y pueden utilizarse para la producción de los dominios o polipéptidos según la invención. Ventajosamente, las construcciones recombinantes según la invención anteriormente descritas se incorporan y expresan en un sistema huésped adecuado. A este respecto se usan preferiblemente métodos de clonación y transfección familiares conocidos para el experto como, por ejemplo, co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares para llevar a la expresión los ácidos nucleicos conocidos en los sistemas de expresión respectivos. Sistemas adecuados se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, Nueva York 1997, o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Como organismos huésped son fundamentalmente adecuados todos los organismos que hacen posible una expresión de los ácidos nucleicos según la invención, sus variantes alélicas, sus equivalentes funcionales o derivados. Por organismos huésped se entiende, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, células animales o vegetales. Organismos preferidos son bacterias, como aquellas de los géneros *Escherichia* como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, microorganismos eucariotas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, células eucariotas superiores de animales o plantas, por ejemplo, células Sf9, CHO o HEK293.

La selección de organismos satisfactoriamente transformados puede realizarse mediante genes marcadores que también están contenidos en el vector o en el casete de expresión. Ejemplos de aquellos genes marcadores son genes para resistencia a antibióticos y para enzimas que catalizan una reacción cromófora que provoca una

coloración de las células transformadas. Éstas pueden seleccionarse mediante citometría automática. Los microorganismos transformados satisfactoriamente con un vector que llevan un gen de resistencia a antibióticos correspondiente (por ejemplo, G418 o higromicina) pueden seleccionarse por medios que contienen antibióticos correspondientes o medios nutrientes. Las proteínas marcadoras que se presentan en la superficie de las células

5 pueden utilizarse para la selección mediante cromatografía de afinidad.

Si se desea, el producto génico también puede llevarse a organismos transgénicos, como animales transgénicos, especialmente ratones, cabras o plantas transgénicas, para la expresión.

10 Son además objeto de la invención procedimientos para la preparación recombinante de dominios o polipéptidos de RGM según la invención o fragmentos funcionales biológicamente activos de los mismos cultivando un organismo huésped recombinante productor de péptidos, dado el caso induciendo la expresión de los polipéptidos y aislando éstos del cultivo. Así, en caso de que se desee, los péptidos también pueden producirse a escala industrial.

15 El huésped recombinante puede cultivarse y fermentarse según procedimientos conocidos. Las bacterias pueden multiplicarse, por ejemplo, en medio TB o LB y a una temperatura de 20 a 40 °C y a un valor de pH de 6 a 9. En particular, condiciones de cultivo adecuadas se describen, por ejemplo, en T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

20 Las células se digieren a continuación, en caso de que los polipéptidos no se secreten en el medio de cultivo, y el producto se obtiene a partir del lisado según procedimientos de aislamiento de proteínas conocidos. Las células pueden opcionalmente digerirse mediante ultrasonidos de alta frecuencia, mediante alta presión, como, por ejemplo, en una celda de presión francesa, mediante osmólisis, mediante la acción de detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, mediante homogeneizadores o mediante la combinación de varios de los procedimientos citados.

Puede conseguirse una purificación de los péptidos con procedimientos cromatográficos conocidos, como cromatografía en tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía en Q-Sepharose, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos habituales como ultrafiltración, cristalización, precipitación por sales, diálisis y electroforesis en gel nativo. Procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en Cooper, T. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, Nueva York o en Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, Nueva York, Heidelberg, Berlin.

30 Para aislar el péptido recombinante es especialmente adecuado usar sistemas de vectores o oligonucleótidos que alargan el ADNc de determinadas secuencias de nucleótidos y así codifican polipéptidos o proteínas de fusión modificados que, por ejemplo, sirven para una purificación más sencilla. Modificaciones adecuadas de este tipo son, por ejemplo, las llamadas "marcas" que hacen de anclaje como, por ejemplo, la modificación conocida como anclaje de hexa-histidina o epítipo que pueden ser reconocidas como antígenos por anticuerpos (descrito, por ejemplo, en Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estos anclajes

40 pueden servir para el anclaje de los péptidos a un soporte sólido como, por ejemplo, una matriz de polímero que puede estar cargada, por ejemplo, en una columna de cromatografía, o puede usarse en una placa de microtitulación o en otro soporte.

45 Al mismo tiempo, estos anclajes también pueden usarse para el reconocimiento de péptidos. Para el reconocimiento de los péptidos pueden usarse además marcadores habituales, como colorantes de fluorescencia, marcadores enzimáticos, que forman un producto de reacción detectable después de la reacción con un sustrato, o marcadores radiactivos, solos o en combinación con los anclajes para la derivatización de los péptidos.

5. Inmunoglobulina

50 5.1 Definición

Son objeto de la presente invención anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma, es decir, anticuerpo con especificidad para

55 una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma. También son objeto de la presente invención partes de estos anticuerpos, especialmente partes de unión al antígeno de los mismos, es decir, fragmentos de anticuerpo que se unen a una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo según la invención se elige de manera que presente una cinética de unión determinada (por ejemplo, alta afinidad, baja disociación, baja constante de disociación (K_{dis}), fuerte actividad neutralizante) para la unión específica a la proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma.

60 Así, pueden proporcionarse anticuerpos con una afinidad por la proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma en el intervalo de $K_D = 10^{-6} - 10^{-12}$ M.

65 Según otro aspecto, los anticuerpos según la invención pueden seleccionarse de forma que se unan a la proteína RGM o derivado/equivalente de la misma con una constante k_{dis} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos

En el caso de los anticuerpos se trata preferiblemente de anticuerpos aislados. Según otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos neutralizantes. A los anticuerpos según la invención pertenecen especialmente anticuerpos monoclonales y recombinantes. El anticuerpo según la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que procede completamente de una única especie, puede también ser, por ejemplo, un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. Según otras formas de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo por injerto de CDR u otra forma de un anticuerpo humanizado.

El término “anticuerpo” se referirá a moléculas de inmunoglobulina que están formadas por 4 cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas están generalmente conectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está formada de tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está formada por un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables que se designan regiones determinantes de la complementariedad (CDR de Complementarity Determining Region) y están mezcladas con regiones conservadas que se designan regiones estructurales (FR de Frame Work Region). Cada región VH y VL está formada por tres CDR y cuatro FR que están dispuestas del extremo N al extremo C en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte del anticuerpo”) se refiere a uno o varios fragmentos de un anticuerpo con especificidad por una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma, poseyendo el o los fragmentos al igual que antes la capacidad de unirse específicamente a la proteína RGM o derivado/equivalente de la misma. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede detectarse por fragmentos de un anticuerpo completo. A los ejemplos de fragmentos de unión pertenecen en el sentido del término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo (i) un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente compuesto de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, es decir, un fragmento bivalente que contiene dos fragmentos Fab conectados entre sí en la región bisagra mediante un puente disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que se compone de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que se compone de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que está constituido de un dominio VH, o VH, CH1, CH2, DH3, o VH, CH2, CH3; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, concretamente VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse además con un ligador sintético usando procedimientos recombinantes, por lo que pueden prepararse como una cadena de proteína única, en la que las regiones VL y VH se juntan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Los anticuerpos monocatenarios de este tipo también estarán comprendidos en el término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo. A ésta también pertenecen otras formas de los anticuerpos monocatenarios como “diacuerpos”. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan sobre una cadena de polipéptido única, usándose no obstante un conector que es tan corto que los dos dominios pueden encontrarse sobre la misma cadena, por lo que se fuerza a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y a formar dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor que se forma mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o varias otras proteínas o péptidos. A aquellas moléculas de inmunoadhesión pertenece el uso de la región central de estreptavidina para producir una molécula de scFv tetramera (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, de un péptido marcador y de una marca de polihistina del extremo C para hacer moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

Las partes del anticuerpo, como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, como la digestión con papaína o pepsina. Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante normalizadas. Un “anticuerpo aislado con especificidad por una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma” transcribe un anticuerpo con especificidad por una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma, que está esencialmente libre de otros anticuerpos con diferentes especificidades por antígeno.

El término “anticuerpo neutralizante” describe un anticuerpo cuya unión conduce a un antígeno determinado para la inhibición de la actividad biológica del antígeno. Esta inhibición de la actividad biológica del antígeno puede evaluarse midiendo uno o varios indicadores de la actividad biológica del antígeno, usando un ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado.

El término “anticuerpo monoclonal” describe un anticuerpo que procede de un hibridoma (por ejemplo, un anticuerpo que se secreta por un hibridoma preparado mediante tecnología de hibridoma, como el método de hibridomas normalizado según Köhler y Milstein). Por tanto, un anticuerpo procedente de un hibridoma con especificidad por

una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma se designa anticuerpo monoclonal.

El término “anticuerpo recombinante” describe anticuerpos que se preparan, expresan, generan o aíslan con medios recombinantes, como anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped; anticuerpos que se aíslan de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante; anticuerpos que se aíslan de un animal (por ejemplo, de un ratón) que es transgénico mediante genes de inmunoglobulina humanos (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295); o anticuerpos que se preparan, expresan, generan o aíslan de cualquier otra manera, en los que las secuencias de genes de inmunoglobulina determinados (como secuencias de genes de inmunoglobulina humanos) están compuestos de otras secuencias de ADN. A los anticuerpos recombinantes pertenecen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, por injerto de CDR y humanizados.

El término “anticuerpo humano” describe anticuerpos cuyas regiones variables y constantes se corresponden con secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana como, por ejemplo, se describe por Kabat et al. (véase Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH nº 91-3242) o proceden de ellas. Los anticuerpos humanos según la invención pueden, no obstante, contener restos de aminoácidos que no están codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que se introducen *in vivo* mediante mutagénesis al azar o específica del sitio o *in vivo* mediante mutación somática), por ejemplo, en las CDR, y especialmente en CDR3. Los anticuerpos humanos recombinantes según la invención tienen regiones variables y también pueden contener regiones constantes que proceden de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (véase Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH nº 91-3242). Según determinadas formas de realización, los anticuerpos humanos recombinantes de este tipo se someten, no obstante, a una mutagénesis *in vitro* (o en caso de que se use un animal transgénico mediante secuencias de Ig humanas, una mutagénesis *in vivo* somática), de manera que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo recombinante sean secuencias que, si bien están emparentadas con secuencias de VH y VL de la línea germinal humana o proceden de ella, no existen *in vivo* naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos. Según determinadas formas de realización, los anticuerpos recombinantes de este tipo son el resultado de una mutagénesis selectiva o retromutación, o ambas.

El término “retromutación” se refiere a un procedimiento en el que algunos o todos de los aminoácidos somáticamente mutados de un anticuerpo humano se sustituyen con los restos de la línea germinal correspondientes de una secuencia de anticuerpo de la línea germinal homóloga. Las secuencias para la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano según la invención se comparan por separado con las secuencias de la línea germinal en la base de datos VBASE para identificar las secuencias con la mayor homología. Desviaciones en el anticuerpo humano según la invención se atribuyen a la secuencia de la línea germinal, mutándose en posiciones de nucleótidos definidas que codifican aquellos aminoácidos divergentes. El significado directo o indirecto de cada aminoácido identificado de esta manera como candidato para una retromutación para la unión al antígeno deberá investigarse, y un aminoácido, que dependiendo de la mutación perjudicará una propiedad deseable del anticuerpo humano, no se incluirá en el anticuerpo humano definitivo. Para mantener el número de aminoácidos para una retromutación tan bajo como sea posible, pueden permanecer invariables aquellas posiciones de aminoácidos que se desvían concretamente de la secuencia de la línea germinal que viene a continuación, pero son idénticas a la secuencia de aminoácidos correspondiente de una secuencia de la línea germinal, suponiendo que la segunda secuencia de la línea germinal sea idéntica y co-lineal con la secuencia del anticuerpo humano según la invención al menos en 10 y preferiblemente en 12 aminoácidos en ambas caras del aminoácido en cuestión. Las retromutaciones pueden realizarse en cualquier etapa de la optimización de anticuerpos.

El término “anticuerpo quimérico” comprende anticuerpos en los que partes individuales de la molécula se derivan de distintas especies. Así, los anticuerpos quiméricos son, sin estar limitados a éstos, por ejemplo, anticuerpos que contienen secuencias para la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie, pero en los que las secuencias de una o varias de las regiones de CDR VH y/o VL están sustituidas con secuencias de CDR de otra especie. En aquellos anticuerpos, las regiones variables pueden presentar la cadena pesada y ligera de ratón en las que una o varias de las CDR de ratón (por ejemplo, CDR3) están sustituidas con secuencias de CDR humanas.

El término “anticuerpo humanizado” describe anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélido, cabra) en las que, sin embargo, por lo menos una parte de la secuencia de VH y/o VL se ha modificado para ser “similar a humana”, es decir, para ser similar a secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo por injerto de CDR en el que se utilizan secuencias de CDR humanas en secuencias de VH y VL no humanas para sustituir las secuencias de CDR no humanas correspondientes.

Un método para medir la cinética de unión de un anticuerpo se basa en la llamada resonancia de plasmones superficiales. El término “resonancia de plasmones superficiales” se refiere a un fenómeno óptico con el que pueden analizarse interacciones bioespecíficas, detectándose cambios de las concentraciones de proteína con una matriz de biosensores, usándose, por ejemplo, el sistema Blacore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y

Piscataway, NJ). Para más descripciones véanse Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

- 5 El término " K_{dis} " describe la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término " K_d " describe la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno determinada.

- 10 La afinidad de unión del anticuerpo según la invención puede evaluarse usando inmunoensayos *in vitro* normalizados, como análisis ELISA o Blacore.

5.2 Preparación de inmunoglobulinas

- 15 5.2.1 Preparación de anticuerpos policlonales

La presente invención se refiere a anticuerpos policlonales contra dominios y polipéptidos de RGM según la invención y a su preparación.

- 20 Para esto, un huésped se inmuniza con por lo menos una proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma; y se obtiene un suero del huésped que contiene el anticuerpo formado como respuesta a la inmunización.

- Si los polipéptidos RGM que van a usarse no son inmunogénicos o solo débilmente inmunogénicos, entonces su inmunogenicidad puede aumentarse acoplándolos a un soporte, preferiblemente una proteína portadora, como hemocianina de lapa californiana (KLH), hemocianina de *Limulus polyphemus* (LPH), albúmina de suero bovino (BSA) o ovoalbúmina (OVA). Para esto están a disposición para el experto una serie de posibilidades de acoplamiento que se conocen en general. Apropriadamente puede ser, por ejemplo, la reacción con glutardialdehído, por ejemplo, mediante la incubación de proteína RGM con un péptido adecuado o mezcla de péptidos en agua o un disolvente acuoso. Esta reacción puede realizarse cómodamente a temperatura del aire ambiente, también generalmente a temperatura ambiente. No obstante, también puede ser apropiado enfriar o calentar ligeramente. Generalmente, la reacción conduce en el transcurso de algunas horas a resultados deseados, una duración de la reacción de, por ejemplo, 2 h se encuentra en el intervalo habitual. La concentración de glutardialdehído se encuentra generalmente en el intervalo de ppm hasta %, apropiadamente de 10 ppm hasta el 1 %, preferiblemente de 100 ppm hasta el 0,5 %. La optimización de los parámetros de reacción se encuentra en la zona de habilidad del experto.

- Además del antígeno, las composiciones generalmente contienen otros coadyuvantes, especialmente normalmente para la inmunización de los adyuvantes utilizados, por ejemplo, adyuvante de Freund. Especialmente se usa adyuvante completo de Freund para la primera inmunización, mientras que todas las inmunizaciones posteriores se realizan con adyuvante incompleto de Freund. Para la preparación de las mezclas de inmunización, el antígeno (inmunogén) se añade, preferiblemente como la mezcla de componentes descrita anteriormente, al o a los coadyuvantes. A este respecto, generalmente se emulsiona el antígeno.

- Como huéspedes son adecuados especialmente roedores o también conejos. A estos u otros huéspedes adecuados se les inyecta la mezcla de inmunización, preferiblemente subcutáneamente. Los títulos de anticuerpo pueden determinarse con un inmunoensayo, por ejemplo, competitivamente con un antisuero de oveja dirigido contra IgG del huésped y proteína RGM marcada. Así, hacia el final de la inmunización puede decidirse si un huésped determinado es adecuado para la obtención de anticuerpos. Si, por ejemplo, se realizan cuatro inmunizaciones, entonces después de la tercera inmunización puede determinarse el título de anticuerpo y luego obtenerse anticuerpos de animales que presentan un título de anticuerpo suficiente.

- Para la obtención del anticuerpo formado se prefiere tomar sangre de los huéspedes durante varias semanas o meses. Finalmente puede dejarse que el huésped se desangre. De la sangre así obtenida puede obtenerse suero de forma conocida que contiene el anticuerpo deseado. El suero completo así obtenido puede, dado el caso, purificarse adicionalmente de forma experta para enriquecer la fracción de anticuerpos contenida en él y especialmente los anticuerpos que reconocen la proteína RGM.

- Según una forma de realización especial de este procedimiento, se selecciona por lo menos un anticuerpo del suero que reconoce específicamente la proteína RGM o un derivado/equivalente de la misma usado como inmunogén. La especificidad significa en este contexto una mayor afinidad de unión del anticuerpo por el inmunogén que por otras proteínas relacionadas, especialmente inmunogénicas.

5.2.2 Preparación de anticuerpos monoclonales

- 65 Pueden obtenerse inmunoglobulinas útiles según la invención usando métodos en sí conocidos. Así, la tecnología de hibridomas permite la preparación de anticuerpos monoespecíficos para un antígeno interesante. Además, se han

desarrollado técnicas de anticuerpos recombinantes, como el cribado *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos con cuya ayuda también pueden prepararse anticuerpos específicos de este tipo.

Así, por ejemplo, un animal puede inmunizarse con el antígeno de interés. Este planteamiento *in vivo* puede además contener que se establezca una serie de hibridomas de los linfocitos o células del bazo de un animal y se seleccione un hibridoma que secreta un anticuerpo que se une específicamente al antígeno. En el caso del animal que va a inmunizarse puede tratarse, por ejemplo, de un ratón, rata, conejo, pollo, camélido u oveja, o de una versión transgénica de uno de los animales previamente conocidos, por ejemplo, un ratón transgénico con genes de inmunoglobulina humanos que produce anticuerpos humanos después de un estímulo antigénico. A otros tipos de animales que pueden inmunizarse pertenecen ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), que se han reconstituido con células sanguíneas mononucleares periféricas humanas (quimera hu-PBMC-IDCG-ratón) o con células linfoides o precursores de las mismas, así como ratones que se tratan con una irradiación corporal total letal, a continuación se protegen de la radiación con células de la médula ósea de un ratón con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) y a continuación se trasplantan con linfocitos humanos funcionales (el llamado sistema trímico). Otro tipo de un animal que va a inmunizarse es un animal (por ejemplo, un ratón) en cuyo genoma se inactivó ("silenció") un gen endógeno que codifica el antígeno de interés, por ejemplo, mediante recombinación homóloga, de manera que después de la inmunización con el antígeno este animal reconoce al antígeno como extraño. Para el experto es evidente que los anticuerpos policlonales o monoclonales preparados con estos procedimientos se caracterizan y seleccionan usando procedimientos de cribado conocidos a los que pertenecen las técnicas de ELISA, sin, sin embargo, limitarse a ésta.

Según otra forma de realización, se criba una biblioteca de anticuerpos recombinantes con el antígeno. La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede expresarse, por ejemplo, sobre la superficie de bacteriófagos o sobre la superficie de células de levadura o sobre la superficie de células bacterianas. La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser, por ejemplo, una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab. Según otra forma de realización, pueden expresarse bibliotecas de anticuerpos como fusiones de ARN-proteína.

Otro planteamiento para la preparación de anticuerpos según la invención contiene una combinación de planteamientos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, el antígeno puede dejarse actuar sobre el repertorio de anticuerpos inmunizando *in vivo* un animal con el antígeno y a continuación cribando *in vitro* una biblioteca de anticuerpos recombinantes preparada a partir de células linfoides del animal o biblioteca de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, con cadena pesada y/o ligera) con el antígeno. Según otro planteamiento, el antígeno puede dejarse actuar sobre el repertorio de anticuerpos inmunizando *in vivo* un animal con el antígeno y a continuación sometiendo a una maduración por afinidad una biblioteca de anticuerpos recombinantes preparada a partir de células linfoides del animal o biblioteca de dominios únicos. Según otro planteamiento, el antígeno puede dejarse actuar sobre el repertorio de anticuerpos inmunizando *in vivo* un animal con el antígeno, seleccionando a continuación células productoras de anticuerpos individuales que secretan un anticuerpo de interés y obteniendo a partir de estas células seleccionadas ADNc para la región variable de la cadena pesada y ligera (por ejemplo, mediante PCR) y expresando las regiones variables de la cadena pesada y ligera *in vitro* en células huésped de mamífero (lo que se denomina el procedimiento de selección de anticuerpos de linfocitos, o SLAM de "Selected Lymphocyte Antibody Method"), mediante el cual las secuencias de genes de anticuerpos seleccionadas pueden seleccionarse y manipularse adicionalmente. Además, pueden seleccionarse anticuerpos monoclonales mediante clonación de la expresión expresando los genes de anticuerpo en células de mamífero para la cadena pesada y ligera y seleccionando aquellas células de mamífero que secretan un anticuerpo con la afinidad de unión deseada.

Con la presente invención se ponen a disposición antígenos definidos en forma de dominios de unión o polipéptidos de RGM para el cribado y contracribado. Así, según la invención pueden seleccionarse aquellos anticuerpos policlonales y monoclonales que presentan un perfil de propiedades deseado según la invención según la definición anterior.

Con el procedimiento según la invención para la preparación de anticuerpos pueden prepararse distintos tipos de anticuerpos. A éstos pertenecen esencialmente anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos por injerto de CDR, así como partes de unión al antígeno de los mismos.

A continuación se describen procedimientos para la preparación de anticuerpos según la invención. A este respecto se diferencia entre planteamientos *in vivo*, planteamientos *in vitro* o una combinación de ambos.

Planteamientos *in vivo*:

A partir de las células productoras de anticuerpos generadas *in vivo* pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante técnicas normalizadas, como la técnica de hibridomas originariamente descrita por Köhler y Milstein (1975, Nature 256:495-497) (véanse también Brown et al. (1981) J. Immunol 127:539-46; Brown et al. (1980) J Biol Chem 255:4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76:2927-31; y Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75). La tecnología para la producción de hibridomas de anticuerpos monoclonales es suficientemente conocida (véanse en general R. H. Kennet, en Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Geffer et al. (1977) Somatic Cell

Genet., 3:231-36). Para esto, una línea celular immortalizada (normalmente un mieloma) se fusiona con linfocitos (normalmente esplenocitos o células de los ganglios linfáticos o linfocitos de sangre periférica) de un mamífero inmunizado con la proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal con especificidad por la proteína RGM según la invención o por un derivado/equivalente de la misma. Para esto puede usarse un protocolo discrecional de los muchos suficientemente conocidos para la fusión de linfocitos y líneas celulares immortalizadas (véanse también G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:550-52; Geffer et al. *Somatic Cell Genet.*, citado arriba; Lerner, Yale J. Biol. Med., citado arriba; Kennet, *Monoclonal Antibodies*, citado arriba). Además, el experto conoce múltiples variaciones de aquellos procedimientos que también son útiles. Normalmente, las líneas celulares immortalizadas procedieron (por ejemplo, una línea de células de mieloma) de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden establecerse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica según la invención con una línea de células de ratón immortalizada. Líneas celulares immortalizadas preferidas son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT). Puede usarse normalmente una línea de células de mieloma discrecional de las muchas líneas de células de mieloma como componentes de fusión, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de células de mieloma pueden obtenerse de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD. Normalmente se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol (PEG). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan luego usando medio HAT, por lo que las células de mieloma no fusionadas y las no productivamente fusionadas se destruyen (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días, ya que no se han transformado). Las células de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma se identifican cribando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para aquellos anticuerpos, por ejemplo, usando una ensayo de ELISA estándar para seleccionar aquellos anticuerpos que pueden unirse específicamente a proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma.

Dependiendo del tipo de anticuerpo deseado pueden usarse distintos animales huésped para la inmunización *in vivo*. Puede usarse un huésped, que él mismo expresa una versión endógena del antígeno de interés. Alternativamente puede usarse un huésped que se hizo deficiente para una versión endógena del antígeno de interés. Por ejemplo, se mostró que ratones que se hicieron deficientes mediante recombinación homóloga en el gen endógeno correspondiente para una proteína endógena determinada (es decir, ratones inactivados) generan una respuesta humoral contra la proteína con la que se inmunizaron y, por tanto, pueden usarse para la preparación de anticuerpos monoclonales de alta afinidad contra la proteína (véanse, por ejemplo, Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Para la preparación de anticuerpos no humanos contra la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma son adecuados muchos mamíferos no humanos como huéspedes para la preparación de anticuerpos. A éstos pertenecen ratones, ratas, pollos, camélidos, conejos y cabras (y versiones inactivadas de los mismos), si bien se prefieren ratones para la preparación de hibridomas. Además, para la preparación de anticuerpos esencialmente humanos contra un antígeno humano con especificidad dual puede usarse animal huésped no humano que expresa un repertorio de anticuerpo humano. A aquellos animales no humanos pertenecen animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que llevan los transgenes de inmunoglobulina humana (quimeras hu-PBMC-IDCG-ratones) y quimeras de irradiación de ser humano/ratón, que se describen en más detalle a continuación.

Según una forma de realización, el animal que se inmuniza con una proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma es un mamífero no humano, preferiblemente un ratón, que es transgénico mediante genes de inmunoglobulina humanos, de manera que el mamífero no humano produce anticuerpos humanos después de un estímulo antigénico. Normalmente, en aquellos animales se introducen transgenes de inmunoglobulina para la cadena pesada y ligera con configuración de la línea germinal humana, modificándose los animales de forma que sean inactivos sus loci endógenos para la cadena pesada y ligera. Si se estimulan estos animales con antígeno (por ejemplo, con un antígeno humano), se producen anticuerpos que proceden de las secuencias de inmunoglobulina humanas (es decir, anticuerpo humano). A partir de los linfocitos de aquellos animales pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos mediante tecnología de hibridomas estándar. Para la descripción adicional de ratones transgénicos con inmunoglobulinas humanas y su uso en la preparación de anticuerpos humanos véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.939.598, los documentos WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 y WO 99/53049 (Abgenix Inc.) y las patentes de EE.UU. n° 5.545.806, n° 5.569.825, n° 5.625.126, n° 5.633.425, n° 5.661.016, n° 5.770.429, n° 5.814.318, n° 5.877.397 y el documento WO 99/45962 (Genpharm Inc.); véase también MacQuitty, J.J. y Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. y Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

Según otra forma de realización, el animal que se inmuniza con la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma puede ser un ratón con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) que se reconstituyó con células sanguíneas mononucleares periféricas humanas o células linfoides o precursores de las mismas. Aquellos ratones, que se designan quimeras hu-PBMC-IDCG-ratones, producen respuestas de inmunoglobulinas humanas como queda comprobado después de un estímulo antigénico. Para la descripción adicional de estos ratones y su uso para la generación de anticuerpos véanse, por ejemplo, Leader, K.A. et al. (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. et al. (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. et al. (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S.E. et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. et al. (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. et al. (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. y Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. et al. (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. et al. (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. et al. (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. et al. (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; y Heard, C. et al. (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

Según otra forma de realización, el animal, que se inmuniza con la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma es un ratón que se trata con una irradiación corporal completa letal, a continuación se protege de la radiación con células de la médula ósea de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) y a continuación se trasplanta con linfocitos humanos funcionales. Este tipo de quimera designada el sistema trímico se usa para preparar anticuerpos monoclonales humanos inmunizando ratones con el antígeno de interés y preparando a continuación anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridomas normalizada. Para la descripción adicional de estos ratones y de su uso para la generación de anticuerpos véanse, por ejemplo, Eren, R. et al. (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y y Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol* 16:242-246; Ilan, E. et al. (1999) *Hepatology* 29:553-562; y Bocher, W.O. et al. (1999) *Immunology* 96:634-641.

Planteamientos *in vitro*:

Alternativamente a la preparación de anticuerpos según la invención mediante la inmunización y selección, según la invención pueden identificarse anticuerpos y aislarse cribando una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinantes con una proteína RGM según la invención o derivado/equivalente de la misma para así aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen específicamente a la proteína RGM o derivado/equivalente de la misma. Los kits para la generación y para el cribado de bibliotecas de expresión pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, el sistema de anticuerpos de fago recombinantes de Pharmacia, nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos SurfZAP® de Stratagene, nº de catálogo 240612). En muchas formas de realización, la biblioteca de expresión es una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab. La técnica de expresión en fago para cribar bibliotecas de anticuerpos recombinantes se ha descrito suficientemente. Ejemplos de procedimientos y compuestos que pueden usarse especialmente ventajosamente en la generación y el cribado de bibliotecas de expresión en anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en McCafferty et al., documento WO 92/01047, patente de EE.UU. nº 5.969.108 y documento EP 589 877 (describe especialmente la expresión de scFv), Ladner et al., patentes de EE.UU. nº 5.223.409, nº 5.403.484, nº 5.571.698, nº 5.837.500 y documento EP 436 597 (describe, por ejemplo, la fusión de pIII); Dower et al., documento WO 91/17271, patente de EE.UU. nº 5.427.908, patente de EE.UU. nº 5.580.717 y documento EP 527 839 (describe especialmente la expresión de Fab); Winter et al., publicación internacional WO 92/20791 y documento EP 368.684 (describe especialmente la clonación de secuencias para dominios de inmunoglobulina variables); Griffiths et al., patente de EE.UU. nº 5.885.793 y documento EP 589 877 (describe especialmente el aislamiento de anticuerpos humanos contra antígenos humanos usando bibliotecas recombinantes); Garrard et al., documento WO 92/09690 (describe especialmente las técnicas de expresión en fago); Knappik et al., documento WO 97/08320 (describe la biblioteca de anticuerpos recombinante humana HuCal); Salfeld et al., documento WO 97/29131 (describe la preparación de un anticuerpo humano recombinante contra un antígeno humano (factor de necrosis tumoral alfa humano), así como la purificación por afinidad *in vitro* del anticuerpo recombinante) y Salfeld et al., solicitud provisional de EE.UU. nº 60/126.603 y las solicitudes de patente basadas en ésta (describe también la preparación de anticuerpo humano recombinante contra antígeno humano (interleucina-12 humana), así como la purificación por afinidad *in vitro* del anticuerpo recombinante).

Otras descripciones de cribados de bibliotecas de anticuerpos recombinantes pueden encontrarse en publicaciones científicas, como Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554; y Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

Alternativamente al uso de sistemas de expresión en bacteriófago, pueden expresarse bibliotecas de anticuerpos recombinantes sobre la superficie de células de levadura o células bacterianas. Los procedimientos para la preparación y para el cribado de bibliotecas que se expresan sobre la superficie de células de levadura se describen en el documento WO 99/36569. Los procedimientos para la preparación y para el cribado de bibliotecas que se expresan sobre la superficie de células bacterianas se describen en mayor detalle en el documento WO 98/49286.

Tan pronto como se identifica un anticuerpo de interés de una biblioteca combinatoria, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo se aíslan mediante técnicas de biología molecular normalizadas, por ejemplo, mediante amplificación por PCR de ADN del paquete de expresión (por ejemplo, del fago) que se ha aislado durante el cribado del banco. El experto conoce las secuencias de nucleótidos de genes para las cadenas de anticuerpos ligeras y pesadas con las que pueden prepararse los cebadores de PCR. Muchas de aquellas secuencias se han descrito, por ejemplo, en Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH nº 91-3242 y el banco de datos para secuencias de la línea germinal humana VBASE.

Puede prepararse un anticuerpo según la invención o parte de anticuerpo expresando recombinantemente los genes para las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o varios vectores de expresión recombinantes que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas del anticuerpo, de manera que las cadenas ligeras y pesadas se expresen en la célula huésped y preferiblemente se secreten en el medio en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden obtenerse de este medio. Se usa metodología de ADN recombinante normalizada para obtener genes para las cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras, para utilizar estos genes en vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células huésped. Una metodología de este tipo se describe, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis (Hrsg.), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (Hrsg.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) y en la patente de EE.UU. nº 4.816.397 de Boss et al.

Tan pronto como se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL del anticuerpo de interés, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente con técnicas de ADN recombinante normalizadas, por ejemplo, para convertir los genes para las regiones variables en genes para cadenas de anticuerpo de longitud completa, en genes para fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se liga operativamente con otra proteína, por ejemplo, una región de anticuerpo constante o un fragmento de ADN que codifica el conector flexible. El término "operativamente ligado" significará aquí que los dos fragmentos de ADN están unidos entre sí de manera que las secuencias de aminoácidos que codifican los dos fragmentos de ADN estén en marco de lectura (en marco).

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen para una cadena pesada de longitud completa ligando operativamente el ADN que codifica la región VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes para las regiones constantes de cadenas pesadas humanas son suficientemente conocidas (véanse, por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que extienden estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR normalizada. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, prefiriéndose una región constante de IgG1 o IgG4. Para obtener un gen para un fragmento Fab de la cadena pesada, el ADN que codifica VH puede ligarse operativamente con otra molécula de ADN que solo codifica la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen para una cadena ligera de longitud completa (así como un gen para una cadena ligera de Fab) ligando operativamente el ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante CL de la cadena ligera. Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana son suficientemente conocidas (véase Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que extienden estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR normalizada. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, prefiriéndose una región constante kappa.

Para generar un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL pueden ligarse operativamente con otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias de VH y VL se expresen como proteína monocatenaria continua, estando unidas entre sí las regiones VL y VH mediante el conector flexible (véanse Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554).

Los dominios individuales VH y VL con especificidad por la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma pueden aislarse de bibliotecas de dominios únicos con el procedimiento anteriormente descrito. Pueden usarse dos cadenas de dominio único de VH (con o sin CH1) o dos cadenas VL o un par de una cadena de VH y una de VL con la especificidad deseada para unir las proteínas RGM según la invención o derivados/equivalentes de las mismas.

Para expresar el anticuerpo recombinante según la invención o partes del anticuerpo, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa pueden insertarse en vectores de expresión, de manera que los genes estén operativamente ligados con secuencias de control de la transcripción y traducción. En este contexto, el término "operativamente ligado" significará que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal

manera que las secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplen su función prevista para la regulación de la transcripción y traducción del gen del anticuerpo.

El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen de forma que sean compatibles con la células huésped usadas para la expresión. El gen para la cadena de anticuerpo ligera y el gen para la cadena de anticuerpo pesada pueden insertarse en vectores separados, o insertarse ambos genes en el mismo vector de expresión, que es el caso normal. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos normalizados (por ejemplo, ligación de sitios de corte con restricción complementarios en el fragmento de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos, en caso de que no estén presentes sitios de corte con restricción). Antes de la inserción de las secuencias para la cadena ligera y pesada, el vector de expresión ya puede llevar secuencias para las regiones de anticuerpo constantes. Por ejemplo, es un planteamiento convertir las secuencias de VH y VL en genes de anticuerpo de longitud completa insertando en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes para la cadena pesada o ligera, de manera que el segmento de VH está operativamente ligado con el o los segmento(s) de CH dentro del vector, y también el segmento VL está operativamente ligado con el segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de la célula huésped. El gen para la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector, de manera que el péptido señal esté ligado en marco de lectura con el extremo N del gen para la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina). Además de los genes para la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión según la invención pueden presentar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes para la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" incluirá promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes para la cadena de anticuerpo. Aquellas secuencias reguladoras se han descrito, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Para el experto es sabido que el diseño del vector de expresión, al que pertenece la sección de secuencias reguladoras, puede depender de factores como la elección de la célula huésped que va a transformarse, de la intensidad de expresión deseada de la proteína, etc. A las secuencias reguladoras preferidas para una expresión en las células huésped de mamífero pertenecen elementos virales que conducen a una fuerte expresión de proteínas en células de mamífero, como promotores y/o potenciadores, que proceden del citomegalovirus (CMV) (como el promotor/potenciador del CMV), virus simio 40 (SV40) (como el promotor/potenciador del SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP de Adenovirus Major Late Promoter) y polioma. Para la descripción adicional de elementos reguladores virales y secuencias de los mismos véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.168.062 de Stinski, patente de EE.UU. n° 4.510.245 de Bell et al. y la patente de EE.UU. n° 4.968.615 de Schaffner et al

Además de los genes para la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes según la invención pueden presentar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, puntos de inicio de la replicación) y genes de marcadores de selección. Los genes de marcadores de selección facilitan la selección de las células huésped en las que se introdujo el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al). Por ejemplo, es habitual que el gen de marcador de selección haga resistente a principios activos como G418, higromicina o metotrexato una célula huésped en la que se utiliza el vector. A los genes de marcadores de selección preferidos pertenecen el gen para la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras se transfectan mediante técnicas normalizadas en una célula huésped. Las distintas formas del término "transfección" comprenderán múltiples técnicas que normalmente se usan para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Si bien es teóricamente posible expresar el anticuerpo según la invención en células huésped procariotas o eucariotas, se prefiere la expresión del anticuerpo en células eucariotas y especialmente en células huésped de mamífero, ya que la probabilidad de que se componga y secrete un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo en aquellas células eucariotas y especialmente células de mamífero es mayor que en células procariotas. Se ha informado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de mayores rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M.A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

A las células huésped de mamífero que se prefieren para la expresión de anticuerpo recombinante según la invención pertenecen células CHO (incluidas las células dhfr⁻CHO que se han descrito en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 y se usan con un marcador de selección de DHFR como se ha descrito, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Si se introducen en las células huésped de mamífero vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo, entonces los anticuerpos se preparan cultivando las células huésped hasta que el anticuerpo se exprese en las células huésped o preferiblemente secretando el anticuerpo en el medio de cultivo, en el que crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir del medio de cultivo usando procedimientos normalizados para la purificación de proteínas.

También pueden usarse células huésped para preparar partes de anticuerpo intacto, como fragmentos Fab o moléculas de scFv. Variaciones de la manera de proceder previamente descrita pertenecen evidentemente a la invención. Por ejemplo, puede desearse transfectar célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo según la invención. Si están presentes cadenas ligeras o pesadas que no son necesarias para la unión del antígeno de interés, entonces el ADN, que codifica o bien una cadena ligera tal o una pesada tal o ambas, puede eliminarse en parte o completamente mediante tecnología de ADN recombinante. Las moléculas que son expresadas por aquellas moléculas de ADN acortadas también pertenecen a los anticuerpos según la invención. Además, pueden prepararse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo según la invención y la otra cadena pesada y ligera poseen especificidad por otro antígeno distinto al de interés, reticulándose un anticuerpo según la invención con un segundo anticuerpo mediante procedimientos químicos normalizados.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo según la invención o partes de unión al antígeno del mismo, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como también la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células dhfr⁻-CHO mediante transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes para la cadena de anticuerpo pesada y ligera están ligados operativamente, respectivamente, con elementos reguladores potenciadores del CMV / promotores de AdMLP para provocar una fuerte transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR con el que pueden seleccionarse las células CHO que están transfectadas con el vector usando la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan, de manera que se expresan las cadenas de anticuerpo pesadas y ligeras, y se obtiene anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular normalizadas para preparar el vector de expresión recombinante para transferir las células huésped, para seleccionar los transformantes, para cultivar las células huésped y para obtener el anticuerpo del medio de cultivo. Así, la invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de un anticuerpo recombinante según la invención cultivando una célula huésped según la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice un anticuerpo recombinante según la invención. El procedimiento puede además contener aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

Alternativamente al cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante expresión en fago, pueden utilizarse otros métodos conocidos para el experto para cribar mayores bibliotecas combinatorias para identificar los anticuerpos según la invención. En un tipo de un sistema de expresión alternativo, la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa en forma de fusiones de ARN-proteína, como se describe en el documento WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302. En este sistema, mediante la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que en su extremo 3' llevan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, entre un ARNm y el péptido o proteína, que codifica, se genera una fusión covalente. Así, un ARNm específico de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, de una biblioteca combinatoria) puede enriquecerse en la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma mediante las propiedades del péptido codificado o de la proteína (por ejemplo, del anticuerpo o de una parte del mismo) como la unión del anticuerpo o partes del mismo. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de los mismos que se obtienen a partir del cribado de aquellas bibliotecas pueden expresarse de la manera anteriormente descrita con agentes recombinantes (por ejemplo, en células huésped de mamífero) y además someterse a purificación por afinidad adicional o bien cribando fusiones de ARNm-péptido en pases posteriores introduciendo mutaciones en la(s) secuencia(s) originariamente seleccionada(s) o bien usando otros procedimientos para la purificación por afinidad *in vitro* de anticuerpo recombinante en la forma anteriormente descrita.

Combinaciones de planteamientos *in vivo* e *in vitro*:

Los anticuerpos según la invención también pueden prepararse utilizando una combinación de planteamientos *in vivo* e *in vitro*, como procedimientos en los que la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma se deja actuar inicialmente sobre un repertorio de anticuerpos *in vivo* en un animal huésped para estimular la producción de anticuerpos que se unen a la proteína RGM o derivado/equivalente, y a continuación se realiza la posterior selección de anticuerpos y/o maduración de anticuerpos (es decir, optimización) con ayuda de una o varias técnicas *in vitro*. Según una forma de realización, un procedimiento combinado tal puede contener que inicialmente se inmunice un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, pollo, camélido, cabra o una versión transgénica de los mismos o un ratón quimérico) con la proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma para estimular una respuesta del anticuerpo contra el antígeno, y a continuación se produzca y críbe una biblioteca de anticuerpos de expresión en fago usando secuencias de inmunoglobulina de linfocitos que se han estimulado *in vivo* mediante la acción de la proteína s RGM o derivado/equivalente. La primera etapa de esta manera de proceder combinada puede realizarse de la forma anteriormente descrita en relación con los planteamientos *in vivo*, mientras que la segunda etapa de esta manera de proceder puede realizarse de la forma anteriormente descrita en relación con los planteamientos *in vitro*. A los métodos preferidos para la hiperinmunización de animales no humanos con el posterior cribado *in vitro* de bibliotecas de expresión en fago que se prepararon a partir de los linfocitos estimulados pertenecen aquellas que se han descrito por BioSite Inc., véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/47343, WO 91/17271, patente de EE.UU. nº 5.427.908 y patente de EE.UU. nº 5.580.717.

Según otra forma de realización, un procedimiento combinado contiene que inicialmente se inmunice un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, pollo, camélido, cabra o una versión inactivada y/o transgénica de los mismos, o un ratón quimérico) con una proteína según la invención o derivado/equivalente de la misma, para estimular una respuesta del anticuerpo contra la proteína RGM o derivado/equivalente de la misma, y seleccione los linfocitos que producen los anticuerpos con la especificidad deseada, cribando hibridomas (preparados, por ejemplo, a partir de los animales inmunizados). Los genes para los anticuerpos o anticuerpos de dominio único se aíslan de los clones seleccionados (mediante procedimientos de clonación normalizados, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) y se someten a una maduración por afinidad *in vitro* para mejorar de esta manera las propiedades de unión del anticuerpo seleccionado o de los anticuerpos seleccionados. La primera etapa de esta manera de proceder puede realizarse de la forma anteriormente descrita en relación con los planteamientos *in vivo*, mientras que la segunda etapa de esta manera de proceder puede realizarse de la forma anteriormente descrita en relación con los planteamientos *in vitro*, especialmente usando procedimientos para la maduración por afinidad *in vitro*, como aquellos que se describen en los documentos WO 97/29131 y WO 00/56772.

En otro procedimiento combinado, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individualmente aislados usando una manera de proceder que es conocida para el experto como el procedimiento de selección de anticuerpos de linfocitos (SLAM) y se describe en la patente de EE.UU. n° 5.627.052, el documento WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En este procedimiento, inicialmente se inmuniza *in vivo* un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, pollo, camélido, cabra o una versión transgénica de los mismos o un ratón quimérico) con la proteína RGM según la invención o un derivado/equivalente de la misma para estimular una respuesta inmunitaria contra la proteína RGM o derivado/equivalente, y a continuación se seleccionan células individuales secretoras de anticuerpos de interés usando un ensayo en placa hemolítica específica de antígeno. Para esto, la proteína RGM o derivado/equivalente de la misma, o moléculas estructuralmente relacionadas de interés, pueden acoplarse a eritrocitos de oveja usando un conector como biotina, por lo que células individuales que secretan anticuerpo con especificidad adecuada pueden identificarse usando el ensayo de placa hemolítica. A continuación de la identificación de células que secretan los anticuerpos de interés, se obtienen ADNc para las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas a partir de las células mediante PCR con transcriptasa inversa y estas regiones variables pueden luego expresarse en relación con regiones de inmunoglobulina constantes adecuadas (por ejemplo, regiones constantes humanas) en células huésped de mamífero como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con secuencias de inmunoglobulina amplificadas que proceden de los linfocitos seleccionados *in vivo* pueden someterse a continuación a otros análisis y selección *in vitro* expandiéndose, por ejemplo, las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpo con la especificidad deseada. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden además manipularse *in vitro*.

6. Productos farmacéuticos

6.1 General

También son objeto de la presente invención productos farmacéuticos (composiciones) que contienen como principio activo una proteína según la invención (proteína RGM; ligandos de unión a la proteína RGM, como anticuerpo anti-proteína RGM) o una secuencia de ácidos nucleicos de la proteína RGM codificante y dado el caso un vehículo farmacéuticamente compatible. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden contener además por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, uno o varios agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de una de las enfermedades descritas en el presente documento.

A los vehículos farmacéuticamente compatibles pertenecen todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, siempre y cuando sean fisiológicamente compatibles.

A los vehículos farmacéuticamente compatibles pertenecen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe y metilcelulosa. Además, las formulaciones pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables o adyuvantes habituales como lubricantes, por ejemplo talco, estearato de magnesio y aceite mineral; humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; conservantes, como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; antioxidantes; anti-irritantes; formadores de quelatos; coadyuvantes para la formación de grageas; estabilizantes de la emulsión; formadores de película; formadores de gel; enmascaradores del olor; correctores del sabor; resinas; hidrocoloides; disolventes; solubilizantes; neutralizantes; aceleradores de la permeación; pigmentos; compuestos de amonio cuaternario; reengrasantes y superengrasantes; pomadas, cremas o bases para aceite; derivados de silicona; coadyuvantes de extensión; estabilizadores; esterilizantes; bases para supositorios; coadyuvantes para comprimidos, como aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes o recubrimientos; agentes de expansión; agentes de secado; opacificantes; espesantes; ceras; plastificantes; aceites blancos. Una configuración correspondiente se basa en el conocimiento experto como se representa, por ejemplo, en Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 4ª edición, Aulendorf: ECV-Editio-Cantor-Verlag, 1996. Véase también Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer Verlag, Heidelberg.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas, por ejemplo, para administración parenteral. Para esto, el principio activo, como, por ejemplo, el anticuerpo, se prepara preferiblemente como disoluciones inyectables con un contenido de principio activo de 0,1 - 250 mg/ml. Las disoluciones inyectables pueden prepararse como forma farmacéutica en forma líquida o liofilizada en un vidrio de roca o vial, una ampolla o una jeringuilla precargada.

5 El tampón puede contener L-histidina (1 - 50 mM, preferiblemente 5 - 10 mM) y presentar un valor de pH de 5,0 - 7,0, preferiblemente de 6,0. A otros tampones adecuados pertenecen, sin limitarse a éstos, tampones de succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio.

10 Puede usarse cloruro sódico para ajustar la tonicidad de la disolución a una concentración de 0 - 300 mM (preferiblemente 150 mM para una forma farmacéutica líquida). Pueden incorporarse crioprotectores para una forma farmacéutica liofilizada como, por ejemplo, sacarosa (por ejemplo, 0 - 10 %, preferiblemente 0,5 - 1,0 % (p/p)). A otros crioprotectores adecuados pertenecen trehalosa y lactosa. Pueden incorporarse cargas para una forma farmacéutica liofilizada, por ejemplo, manitol (por ejemplo, 1 - 10 %, preferiblemente 2 - 4 % (p/p)). Pueden usarse
15 estabilizadores tanto en formas farmacéuticas líquidas como también liofilizadas, por ejemplo, L-metionina (por ejemplo, 1 - 50 mM, preferiblemente 5 - 10 mM). A las otras cargas adecuadas pertenecen glicina y arginina. Igualmente pueden usarse tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (por ejemplo, 0 - 0,05 %, preferiblemente 0,005 - 0,01 % (p/p)). A otros tensioactivos pertenecen polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.

20 Las composiciones según la invención pueden adoptar múltiples formas. A éstas pertenecen formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infundibles, lociones, colirios y gotas óticas), liposomas, dispersiones o suspensiones y formas sólidas, como polvos, polvos antimaculantes, gránulos, comprimidos, pastillas, sobres, sellos, grageas, cápsulas como cápsulas de gelatina dura y blanda, supositorios o formas farmacéuticas vaginales, formas farmacéuticas semisólidas, como pomadas, cremas,
25 hidrogeles, pastas o parches. También pueden usarse dispositivos de administración implantables para la administración de los principios activos según la invención. La forma preferida depende del tipo de administración prevista y de la aplicación terapéutica. Normalmente se prefieren composiciones en forma de disoluciones inyectables o infundibles. Una forma de administración adecuada es, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, intravenosa subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Según una forma de realización preferida, el principio activo se administra por infusión o inyección intravenosa. Según otra forma de realización preferida, el principio activo se
30 administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas deben ser normalmente estériles y estables bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como disolución, microemulsión, dispersión, estructura liposómica u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de principio activo. Pueden prepararse
35 disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (como, por ejemplo, el anticuerpo) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, dado el caso con una sustancia contenida o una combinación de las sustancias contenidas previamente mencionadas, dependiendo de la necesidad, y a continuación esterilizando por filtración. Las dispersiones se preparan generalmente incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que
40 contiene un medio de dispersión de base y dado el caso otras sustancias contenidas necesarias. En caso de un polvo liofilizado estéril para la preparación de disoluciones inyectables estériles, el secado a vacío y el secado por pulverización representan procedimientos de preparación preferidos con los que se obtiene un polvo de la sustancia contenida activa y dado el caso otras sustancias contenidas deseadas a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración. La fluidez adecuada de una disolución puede conservarse usando, por ejemplo, un
45 recubrimiento como lecitina, conservando en caso de dispersiones el tamaño de partícula necesario o usando tensioactivos. Puede conseguirse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incorporando en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los principios activos según la invención pueden administrarse con una pluralidad de procedimientos que son conocidos para el experto, si bien para muchas aplicaciones terapéuticas la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión representan el tipo de administración preferido. El experto sabe que la vía y/o tipo de administración dependen del resultado deseado. Según determinadas formas de realización, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protege al compuesto de la rápida liberación, así, por ejemplo, una formulación con liberación controlada, a la que pertenecen implantes, parches transdérmicos y sistemas de
50 liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones son en general conocidos para el experto, véase, por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

60 Según determinadas formas de realización, un principio activo según la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, en un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El principio activo (y, si se desea, otras sustancias contenidas) también puede estar encerrado en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimirse en comprimidos o añadirse directamente al alimento. Para la administración terapéutica oral, los principios activos pueden mezclarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos tragables, comprimidos bucales, cápsulas,
65 elixires, suspensiones, jarabes y similares. Si un principio activo según la invención debe administrarse mediante una vía distinta a la parental, puede ser necesario elegir un recubrimiento de un material que impide su inactivación.

Los principios activos según la invención pueden administrarse junto con uno o varios agentes terapéuticos adicionales que son útiles en el tratamiento de las enfermedades previamente descritas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención contienen generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de por lo menos uno de los principios activos según la invención. En función del tratamiento deseado, de si, por ejemplo, se desea un tratamiento terapéutico o profiláctico, pueden elegirse planes de dosificación y adaptarse. Por ejemplo, puede administrarse una dosis única, distribuirse varias dosis separadas con el tiempo o una dosificación creciente o decreciente dependiendo de los requisitos de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parentales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y para garantizar una uniformidad de la dosificación.

El médico que trata puede determinar sin más la forma de administración más adecuada para la terapia respectiva y el principio activo respectivo, tipo de administración y dosificación.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un principio activo según la invención puede encontrarse, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 - 20 mg/kg y preferiblemente 1 - 10 mg/kg, sin limitarse a ésta. Naturalmente, estas cantidades pueden variarse dependiendo del tipo y gravedad del estado que va a aliviarse.

6.2 Vacunas

Las proteínas RGM según la invención y derivados/equivalentes de las mismas son útiles como inmunogén para la vacunación de un paciente que va a tratarse.

Para este fin, vacunas útiles representan generalmente una composición farmacéutica que contiene por lo menos una proteína RGM según la invención y/o por lo menos un derivado/equivalente de la misma según la invención. Además, la composición puede contener un vehículo fisiológicamente compatible y dado el caso otros coadyuvantes, por ejemplo, inmunoestimulantes.

Aunque en principio pueden elegirse discrecionalmente vehículos adecuados, el tipo de vehículo depende generalmente de la vía de administración. Así, las vacunas según la invención pueden formularse especialmente en una forma adecuada para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular y subcutánea. En estos casos, el vehículo contiene preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera y/o un tampón.

Pueden usarse cualquiera de una pluralidad de inmunoestimulantes en las vacunas según la invención. Por ejemplo, puede incluirse un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia que protegerá al antígeno de una rápida degradación, como hidróxido de aluminio o un aceite mineral, así como uno de lípido A, proteína derivada de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Adyuvantes adecuados pueden generalmente obtenerse comercialmente, por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund; AS-2; sales de aluminio, como hidróxido de aluminio (dado el caso como gel) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil-lípido A. También pueden usarse como adyuvantes citocinas, como GM-CSF o interleucina-2, -7 o -12.

7. Terapia

7.1. Tratamiento de enfermedades neuronales

Por el estado de la técnica ya se sabe que en las lesiones del sistema nervioso central puede observarse una acumulación de la proteína RGM en el sitio de lesión (véase Schwab et al. en el lugar indicado). Al mismo tiempo, mediante esto se evita el nuevo crecimiento de las fibras nerviosas dañadas. Esta acción perjudicial sobre el crecimiento de fibras nerviosas está mediada por la unión de RGM a la molécula receptora neogenina. Por este motivo, una modulación, especialmente inhibición, de la interacción entre RGM y la molécula receptora neogenina sería adecuada para prevenir la actividad inhibidora de RGM sobre el crecimiento de fibras nerviosas.

7.2. Tratamiento de enfermedades tumorales

Desde hace tiempo hay indicaciones que suponen que la neogenina podría estar causalmente relacionada con la aparición y/o la progresión de enfermedades tumorales. Así, por ejemplo, Meyerhardt et al., informaron en *Oncogene* (1997) 14, 1129-1136, que la neogenina era detectable en más de 50 líneas de células cancerígenas investigadas, entre ellas líneas celulares de glioblastoma, meduloblastoma, neuroblastoma, así como líneas celulares de carcinomas colorrectales, de mama, páncreas y de cuello de útero. Se observó además una expresión en exceso de la neogenina en líneas celulares de cáncer de esófago (Hue et al., *Clinical Cancer Research* (2001) 7, 2213-2221). Una investigación sistemática de los perfiles de expresión de 3588 genes en 211 pacientes con adenocarcinoma de pulmón proporcionó hace poco otra indicación más de la participación de la neogenina en la aparición y la evolución de la enfermedad tumoral (Berrar et al., *J. Comput. Biol.* (2005) 12 (5), 534-544).

Como además se sabe que la RGM presenta una posible acción fomentadora de tumores en la que puede prevenirse la muerte celular por la unión al receptor de neogenina asociado a células tumorales (Matsunaga et al., Nature Cell Biol. 6, 749 - 755, 2004), mediante la modulación de la interacción RGM-neogenina, especialmente mediante la interrupción de esta interacción con ayuda de anticuerpo anti-RGM específico, podría conseguirse un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades tumorales.

7.3. Tratamiento de enfermedades del metabolismo del hierro

RGM C, también llamada hemojuvelina, es de importancia esencial para el metabolismo del hierro del cuerpo humano y animal. La hemocromatosis juvenil es una enfermedad del metabolismo del hierro hereditaria relativamente rara que se manifiesta en una sobrecarga de hierro del organismo. Para la aparición de esta enfermedad, las mutaciones en la molécula de hemojuvelina son las causantes (véase Huang et al., The Journal of Clinical Investigation (2005), 115, 2087-2091). La administración de proteína RGM según la invención funcional o sus dominios activos representa, por tanto, un enfoque terapéutico útil para el alivio de enfermedades del metabolismo del hierro de este tipo.

7.4. Promoción de la formación de tejido óseo

En el estado de la técnica hay indicaciones de que un miembro de la familia RGM de las proteínas, concretamente RGM B, también conocido con el nombre DRAGON, participa en la morfogénesis del hueso. Así, por ejemplo, Samad et al. describen en JBC Papers in Press, edición del 25 de enero de 2005, la interacción entre DRAGON y los receptores del tipo I y tipo II de la proteína morfogenética ósea (BMP). Mediante la administración de polipéptidos RGM según la invención es, por tanto, posible una acción que fomenta el crecimiento de hueso y, por tanto, un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades con crecimiento óseo alterado o de lesiones óseas.

8. Diagnóstico

Como agentes diagnósticos pueden mencionarse según la invención especialmente proteína RGM y derivados/equivalentes según la definición anterior, así como anticuerpos dirigidos contra ella.

Por tanto, la presente invención hace posible especialmente la determinación cualitativa o cuantitativa mejorada de los estados de enfermedad anteriormente definidos mediante la detección de antígenos o anticuerpos típicos de enfermedad.

La determinación se realiza preferiblemente con métodos inmunológicos. Fundamentalmente, esto puede realizarse con cada procedimiento de prueba analítico o diagnóstico en el que se utilicen anticuerpos. A éstos pertenecen técnicas de aglutinación y de precipitación, inmunoensayos, procedimientos inmunohistoquímicos y técnicas de inmunotransferencia, por ejemplo, transferencia Western o procedimiento de transferencia puntual. También pertenecen a éstos procedimientos *in vivo*, por ejemplo, procedimientos de obtención de imágenes.

Es ventajosa la utilización en inmunoensayos. Son adecuados tanto inmunoensayos competitivos, es decir, antígeno y antígeno marcado (trazador) compiten por la unión al anticuerpo, como también inmunoensayos de sándwich, es decir, la unión del anticuerpo específico al antígeno se detecta con un segundo anticuerpo, principalmente marcado. Estos ensayos pueden ser tanto homogéneos, es decir, sin una separación en fase sólida y líquida, como también heterogéneos, es decir, marcas unidas se separan de sin unir, por ejemplo, mediante anticuerpos unidos a fases sólidas. Los distintos formatos de inmunoensayos heterogéneos y homogéneos pueden asignarse a determinadas clases dependiendo del marcado y método de medición, por ejemplo, RIA (radioinmunoensayos), ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia), TRFIA (FIA resuelto en el tiempo), IMAC (inmunoactivación), EMIT (ensayo inmunológico multiplicado por enzimas), TIA (inmunoensayo turbidimétrico), I-PCR (inmuno-PCR).

Para la determinación del antígeno según la invención se prefieren inmunoensayos competitivos. A este respecto, el antígeno marcado (trazador) compete con el antígeno de la muestra que va a cuantificarse por la unión al anticuerpo usado. A partir de la cantidad de trazador desplazado, con ayuda de una curva estándar puede determinarse la cantidad de antígeno, es decir, la cantidad de antígeno, en la muestra.

De las marcas puestas a disposición para este fin han demostrado ser ventajosas las enzimas. Por ejemplo, pueden usarse sistemas basados en peroxidasa, especialmente de la peroxidasa de rábano picante, de la fosfatasa alcalina y de la β -D-galactosidasa. Para estas enzimas están a disposición sustratos específicos cuya reacción puede seguirse, por ejemplo, fotométricamente. Los sistemas de sustrato adecuados se basan en p-nitrofenilfosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/azul nitro-tetrazolio (BCIP/NPT), Fast-Red/naftol-AS-TS-fosfato para la fosfatasa alcalina; ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPD), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinonhidrazona (MBTH) para peroxidasa; o-nitrofenil- β -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactósido y 4-metilumbellifenil- β -D-galactósido (MUG) para la β -D-galactosidasa. Estos sistemas de sustrato pueden obtenerse comercialmente en muchos casos en forma lista para uso, por ejemplo, en forma de comprimidos

que también pueden contener otros reactivos, como tampones adecuados y similares.

El acoplamiento de marcas a péptidos o anticuerpos para la preparación de trazadores puede realizarse de forma en sí conocida. Además, están a disposición una serie de marcas apropiadamente modificadas para la conjugación con proteínas, por ejemplo, enzimas conjugadas con biotina, avidina, extravidina o estreptavidina, enzimas activadas con maleimida y similares. Estas marcas pueden hacerse reaccionar directamente con la molécula que va a usarse según la invención.

Si se elige un formato de inmunoensayo heterogéneo, entonces el complejo de antígeno-anticuerpo puede unirse al soporte para fines de separación, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-idiotípico acopado al soporte, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo. Los soportes, especialmente placas de microtitulación, que están recubiertos con anticuerpos correspondientes son conocidos y pueden obtenerse comercialmente.

Otro objeto de la presente invención son conjuntos de inmunoensayo con por lo menos un anticuerpo anteriormente descrito y otros componentes. A este respecto se trata de una composición, generalmente como unidad de embalaje, de agentes para la realización de una determinación según la invención. Con el fin de una manipulación lo más sencilla posible, estos agentes se proporcionan preferiblemente esencialmente listos para uso. Una disposición ventajosa ofrece el inmunoensayo en forma de kit. Un kit comprende generalmente varios recipientes para la disposición separada de los componentes. Todos los componentes pueden proporcionarse en disolución lista para uso, como concentrado para diluir o como sustancia seca o liofilizado para disolver o suspender; componentes individuales o todos los componentes pueden conservarse congelados o a temperatura ambiente hasta uso. Los sueros están preferiblemente congelados criogénicamente, por ejemplo, a -20 °C, de manera que en estos casos un inmunoensayo debe mantenerse antes de uso preferiblemente a temperaturas de congelación.

Otros componentes incluidos en el inmunoensayo pueden ser: proteína patrón, trazador; suero de control, placa de microtitulación, preferiblemente recubierta con anticuerpo, tampones, por ejemplo, para la prueba, para el crecimiento o para la reacción del sustrato, y el propio sustrato enzimático.

Los principios generales de los inmunoensayos y la generación y uso de los anticuerpos como coadyuvante en el laboratorio y la clínica se encuentra, por ejemplo, en Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow, E., and Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

9. Procedimiento de cribado

También son objeto de la invención procedimientos para la detección de efectores del receptor de RGM neogenina, incubándose una muestra en la que se sospecha un efector con una proteína o polipéptido RGM e investigando la preparación para la formación de un complejo de efector - proteína RGM.

Efectores de este tipo pueden poseer acción agonista, parcialmente agonista, antagonista o inversamente agonista. Éstos pueden ser, por ejemplo, sustancias sintéticas de bajo peso molecular, pépticos sintéticos, moléculas de anticuerpo naturales o sintéticas o sustancias naturales.

Tales procedimientos según la invención se realizan generalmente como procedimientos de cribado *in vitro* con los que a partir de una pluralidad de distintas sustancias pueden leerse aquellas que parece que son las más prometedoras en cuanto a una aplicación futura.

Por ejemplo, mediante química combinatoria pueden aplicarse amplias bibliotecas de sustancias que comprenden múltiples posibles principios activos. El muestreo de bibliotecas de sustancias combinatorias en sustancias con actividad deseada es automatizable. Los robots de cribado sirven para la eficaz evaluación de ensayos individuales dispuestos preferiblemente sobre placas de microtitulación. Así, la presente invención también se refiere a procedimientos de cribado, es decir, tanto procedimientos de cribado primario como también secundario, en los que se utiliza preferiblemente por lo menos uno de los procedimientos descritos a continuación. Si se utilizan varios procedimientos, entonces puede producirse desplazado en el tiempo o simultáneamente en la misma muestra o en distintas muestras de una sustancia que va a investigarse.

Una tecnología eficaz para la realización de procedimientos de este tipo es el ensayo de proximidad de centelleo conocido en el campo del cribado de principios activos, abreviado SPA. Kits y componentes para la realización de este ensayo pueden conseguirse comercialmente, por ejemplo, en Amersham Pharmacia Biotech. En principio, receptores solubilizados o unidos a membrana se inmovilizan sobre microesferas de flúor pequeñas que contienen la sustancia de centelleo. Si se une, por ejemplo, un radioligando a los receptores inmovilizados, entonces la sustancia de centelleo se excita para la emisión de luz, ya que se da la proximidad espacial entre la sustancia de centelleo y el radio ligando.

Otra tecnología eficaz para la realización de procedimientos de este tipo es la tecnología FlashPlateR conocida en el campo del cribado de principios activos. Kits y componentes para la realización de este ensayo pueden conseguirse comercialmente, por ejemplo, en NEN Life Science Products. Este principio también se basa en placas de

microtitulación (de 96 ó 384) que están recubiertas con sustancia de centelleo.

Las sustancias identificables según este procedimiento o partes de mezclas de sustancias también son objeto de la presente invención.

La invención se explica ahora más detalladamente en relación con los siguientes ejemplos de preparación y de aplicación no limitantes.

Parte experimental

1. Indicaciones generales

Método de prueba 1: Representación de la acción de péptidos RGM en experimentos de crecimiento neuronal con neuronas corticales de la rata

Para investigar la acción *in vitro* de péptidos RGM, se realizaron experimentos de crecimiento neuronal. Para esto se prepararon neuronas corticales de rata usándose los siguientes medios:

Medio de partida por litro: 90 ml de GB5, 100 ml de medio esencial mínimo - Eagle (10x; Gibco, n° de pedido: 21430.020), hasta 1000 ml con agua Millipore. pH 7,0, 280-310 mosm.

GB5 por litro: 26,6 g de NaHCO₃, 44,4 g de glucosa, esterilizado por filtración.

Medio de siembra en placa (PM) por litro: Glutamina 0,8 mM, 100 ml de suero bovino fetal inactivado con calor (FCS), 100 ml de suero de caballo inactivado con calor, hasta 1000 ml con medio de partida

Medio de mantenimiento (EM) por litro: Glutamina 0,8 mM, 100 ml de suero de caballo inactivado con calor, hasta 1000 ml con medio de partida

Disolución de tripsina: 0,1 % de tripsina, 0,04 % de EDTA en PBS sin calcio/magnesio, esterilizado por filtración.

Para la obtención de neuronas corticales, ratas preñadas se sacrificaron mediante estiramiento, se abrió su cavidad abdominal, se extirpó el útero con los embriones (día embrionario 18 (E18)) y se lavaron en PBS. Con una tijeras de disección, el útero se cortó longitudinalmente, se extrajeron los embriones y se diseccionaron. Los embriones se sacrificaron mediante corte en la nuca, se extrajo el cerebro y se diseccionó la corteza del prosencéfalo. Las cortezas se incuban cada una en 1 ml de una disolución al 0,1 % de tripsina durante 5 minutos a 37 °C, la reacción se detiene con medio de mantenimiento (EM) y después de 5-4 minutos de incubación se trituran en total en 10 ml de EM con pipetas Pasteur pulidas al fuego con diámetro de abertura decreciente. La suspensión de células se separó por centrifugación 10 minutos a 1200 rpm y se aspiró el sobrenadante y se desechó. El sedimento celular se recogió en 8 ml de EM y se resuspendió cuidadosamente. Las células se contaron en una cámara de recuento Neubauer, el número de células se ajustó a aproximadamente 400.000 células/0,2 ml en EM y se pre-agregó. Para esto, por pocillo se añadieron 200 µl de la suspensión celular sobre portaobjetos con cámara de vidrio (LabTek, n° de pedido 177402) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. A este respecto se forman agregados de neuronas. Se sembraron 10-80 µl de estos agregados por pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina (por ejemplo, placa negra de 96 pocillos Biocoat de Becton Dickinson n° 354640) y dado el caso se completaron con EM hasta 70-90 µl. Después de 1 h, los péptidos RGM se añadieron a distintas concentraciones en un volumen de 10 µl y dado el caso se completaron con EM hasta 100 µl. 24-48 h después, el crecimiento de neuronas se evaluó inicialmente mediante investigación con microscopio óptico y los cultivos se fijaron después mediante la adición de 100 µl de disolución al 4 % de paraformaldehído y se almacenaron al menos 12 horas a 4 °C. Todas las etapas para la representación del citoesqueleto de tubulina mediante tinción inmunofluorescente, con excepción de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron una vez con 100-300 µl de PBS durante 5-15 minutos y después las células se permeabilizaron durante 10-20 min mediante incubación en 100 µl de 0,1 % de Triton X-100. Los pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de PBS durante 5-15 minutos y a continuación se incubaron durante 60 minutos con 100 µl de disolución al 1 % de albúmina de suero bovino en PBS. El anticuerpo primario (por ejemplo, Sigma, monoclonal anti-β-tubulina isotipo III clon SDL 3D10, #T8660; Abcam, TuJ1 #ab14545) se diluyó 1:1000 en disolución al 1 % de albúmina de suero bovino en PBS y se incubaron 50 µl por pocillo durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 100-300 µl de PBS durante 5-15 minutos. El anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (Jackson ImmunoResearch, Cy3 conjugated Affinity Pure Donkey Anti Mouse # 715-165-151) se diluyó 1:500 en disolución al 1 % de albúmina de suero bovino en PBS, que contuvo adicionalmente 0,5 µg/ml de bisbencimida (H33258) para la representación de los núcleos de las células y 50 µl de esta dilución se incubaron por pocillo durante 1-2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con 100-300 µl de PBS durante 5-15 minutos, se aspiró el PBS y se añadió una gota (aproximadamente 50 µl) de Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc#010001) por pocillo. La toma de imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss, Axiovert 200 M), en el que se adquirieron respectivamente la fluorescencia del anticuerpo secundario marcado y la fluorescencia de la

bisbencimida. La superficie cubierta por las dos fluorescencias se determinó con la ayuda de un programa de evaluación de imágenes (Media Cybernetics, Image-pro Plus). Para la determinación del índice de crecimiento de neuronas (NW-I), se formó la diferencia superficial entre la tinción del anticuerpo secundario (tinción de las neuronas elutriadas y de los agregados celulares) y la tinción de la bisbencimida (tinción de los agregados celulares) y se dividió entre la superficie de la tinción con bisbencimida. Así, este índice representa una masa de la superficie cubierta con neuronas en relación con el tamaño de agregados celulares.

Método de prueba 2: Representación de la acción de péptidos RGM en experimentos de crecimiento neuronal con neuronas humanas corticales

Se establece la línea celular de carcinoma pluripotente humana NTera (DSMZ ACC527) como modelo de cultivo celular. A este respecto, las neuronas crecer a partir de agregados celulares y forman una corona de neuronas alrededor del agregado respectivo.

Para esto, se sembraron $2,5 \times 10^6$ células NTera en una botella de 175 cm^2 y se diferenciaron durante 3 semanas con ácido retinoico $10 \text{ }\mu\text{M}$ (Sigma) (medio: D-MEM (Gibco/Invitrogen 31966-021) 10 % de suero bovino fetal, 100 u/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (ambos de Gibco/Invitrogen)). Las células diferenciadas se dividieron a continuación 1:6 en botellas nuevas y se cultivaron sin ácido retinoico durante otros 2 días. Las células neuronales adheridas sobre el césped celular formado se disolvieron mediante repulsión y se agregaron en un matraz con agitación en medio neurobasal (medio neurobasal (Gibco/Invitrogen 21103-049), L-glutamina 2 mM (Gibco/Invitrogen 25030-024), 100 u/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (ambos de Gibco/Invitrogen) durante la noche (en incubadora) mediante agitación lenta.

Los agregados de NTera se sembraron al día siguiente en placas de 96 pocillos de poli-D-Lisina y laminina (Sigma) ($10 \text{ }\mu\text{g/ml}$) (placa negra/clara de 96 pocillos Cellware con poli-D-lisina Biocoat (Becton Dickinson # 35 6640). La acción inhibitoria de los péptidos RGM y fragmentos se analizó mediante la adición de diferentes concentraciones de las sustancias a probar.

Método de prueba 3: Prueba de unión de RGM A - neogenina:

a) Materiales:

- Inmunoplaqueta: Cert. Maxi Sorp F96 (NUNC, 439454)
- RGM A humana recombinante, R&D System; prod. n° 2495-RM ($260 \text{ }\mu\text{g/ml}$)
- Fc de neogenina recombinante humano, Abbott; Ludwigshafen (ALU 1514/122; $425 \text{ }\mu\text{g/ml}$)
- Fragmento AK de ratón anti-IgG-Fc humana purificado por afinidad conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno Research, código: 209-035-098 ($0,8 \text{ mg/ml}$))
- Sustrato revelador: Kit de sustrato Immuno Pure TMB (Pierce, n° 34021)
- Ácido sulfúrico (Merck, n° 4.80354.1000)

b) Método:

1. Unión de RGM A a la inmunoplaqueta:

- $2,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ de RGM A (R&D) en Na_2CO_3 50 mM ($50 \text{ }\mu\text{l/pocillo}$)
- Incubación 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$

2. Etapa de lavado:

- Lavar 3 x con PBS/ $0,02 \text{ }\%$ de Tween20 ($100 \text{ }\mu\text{l/pocillo}$)

3. Bloqueo de sitios de unión inespecíficos

- Bloqueo con $3 \text{ }\%$ de BSA en PBS/ $0,02 \text{ }\%$ de Tween ($200 \text{ }\mu\text{l/pocillo}$)
- Incubación 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$

4. Unión de neogenina:

- Adición de neogenina en diluciones (conc. inicial $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$) en $1 \text{ }\%$ de BSA PBS/ $0,02 \text{ }\%$ de Tween
- Incubación 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$

5. Etapa de lavado:

- Lavar 3 x con PBS/ $0,02 \text{ }\%$ de Tween20 ($100 \text{ }\mu\text{l/pocillo}$)

6. Detección de anticuerpo de la neogenina unida:

- Adición del fragmento AK de ratón anti-IgG-Fc humana acoplado a HRP (diluido 1:2500 en PBS/1 % de BSA) (50 µl/pocillo)
- Incubación 1 h a 37 °C

7. Etapa de lavado:

- Lavar 3 x con PBS/ 0,02 % de Tween20 (100 µl/pocillo)

8. Revelado

- Adición de 50 µl/pocillo del sustrato de revelado (sustrato Immuno Pure TMB, Pierce)
- Incubación 1-30 min, temperatura ambiente,
- Parar la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M/pocillo

2. Ejemplos de preparación

Ejemplo de preparación 1: Preparación de fragmentos de proteína RGM A en células de mamífero

Para la caracterización del dominio de RGM A activo en el procedimiento de crecimiento de neuronas y de prueba de la unión de neuronas a neogenina, RGM A (aa 168-422), así como fragmentos de RGM A de 70-80 aa de tamaño (Frag. 1: 169-238; Frag. 2: 218-284; Frag. 3: 266-335; Frag. 4: 316-386; Frag. 5: 369-238; y Frag. 6: (168-422)) en células de mamífero (HEK293), se expresaron como proteínas de fusión de AP.

Para esto, el ADN codificante para el fragmento respectivo se clonó en el vector pDEST AP/ccdb/Myc/His (Invitrogen, sistema de vector Gateway) (AP – fosfatasa alcalina; PPC – proteasa PreScisson). El ADN que codificaba la zona del fragmento respectiva se amplificó para este fin mediante PCR a partir del clon RZPD (clon AL136826 (DKFZp434D0727); secuencia de RZPD publicada: BC015886, AL136826). Para esto se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Fragmento 169-238:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCCACA
CCTCAGGACTTTTACCGAC (SEC ID N°: 11)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTCGTCCATCTCAGCCTGGTACACC (SEC
ID N°: 12)

Fragmento 218-284:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCATCATC
TTCAAGAACTTCCAGGAGTGTG (SEC ID N°: 13)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCGCACCATGGTGGTG (SEC ID N°:
14)

Fragmento 316-386

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGG
CCCTCAGGCCAGCACGTGGAGATCC (SEC ID N°: 15)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTCAGCATTGGTGTGGAAGGCC (SEC ID
N°: 16)

Fragmento 266-335

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGCG
GGGCTGCCCTC (SEC ID N°: 17)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCCGTGGTGAGGAGGTGCG (SEC ID N°:
18)

Fragmento 368-422

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCC
CTGCCGGTGGAGACCTGTAC (SEC ID N°: 19)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCTGGCAGGTCCCGAGTC (SEC ID
N°: 20)

Fragmento 169-422

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGGCCC
CCACACCTCAGGACTTTTACCGAC (SEC ID N°: 21)
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCCTGGCAGGTCCCGAGTC (SEC ID
N°: 22)

- 5 Los productos de PCR obtenidos se clonaron mediante recombinación específica (attL x attR) en el vector pDEST AP/ccdb/Myc/His y se comprobó la secuencia correcta mediante secuenciación.

Se transfectaron células HEK293 (ATCC CRL 1573) con los plásmidos. Para esto, se sembraron células el día antes de la transfección en placas de 15 cm con una densidad del 80 %. Al día siguientes, el ADN se mezcló
10 correspondientemente a las instrucciones del fabricante con lipofectamina 2000 (Invitrogen) y las células se incubaron 12 h. Después de otras cuatro semanas de cultivo bajo condiciones de cultivo selectivas (D-MEM (Gibco/Invitrogen 31966-021) 10 % de suero bovino fetal, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (ambos de Gibco/Invitrogen), 150 µg/ml de zeocina/Invitrogen), se seleccionaron los clones que se expresaban establemente en medio de crecimiento mediante detección de la fosfatasa alcalina.

15 Para la producción de proteína, se amplificaron las células que se expresaban establemente en el medio de crecimiento y al alcanzar una confluencia del 70 % se transfirieron a medio de producción (medio pro293 (BioWhittaker/Cambrex, 12-764Q), glutamina 2 mM (Invitrogen)). Después de otros 4 días de cultivo, el medio de producción se recogió, se separó del residuo de células y se enriqueció con ayuda de concentradores de membrana (Vivaspin30).
20

A continuación, las proteínas de fusión de AP-RGM expresadas se purificaron de los sobrenadantes con ayuda de cromatografía de afinidad por quelato de Ni. Para esto, se equilibró Ni-NTA-agarosa (Quiagen) en tampón A (HEPES 50 mM-KOH, NaCl 100 mM, 10 % de glicerol, imidazol 10 mM). El sobrenadante concentrado se incubó a
25 continuación 1 h a 4 °C con oscilación con Ni-NTA-agarosa. Después de lavar tres veces Ni-NTA-agarosa separado por centrifugación, se eluyó la proteína unida con tampón de elución (tampón A con imidazol 250 mM).

El análisis de la proteína se realizó con ayuda de análisis de transferencia puntual, SDS-PAGE y transferencia Western. La determinación de la concentración se realizó mediante la determinación de proteína por Bradford y la
30 medición por ELISA de la concentración de AP.

3. Ejemplos de realización

Ejemplo de realización 1: Análisis de fragmentos con células HEK293 que expresan neogenina

35 a) General:

Hasta la fecha se sabía que la actividad inhibidora del crecimiento activa de la proteína RGM A de pollo se encontraba en el intervalo entre la posición de aminoácidos 150 y 350.

40 Por tanto, se prepararon fragmentos de la proteína RGM A humana que cubrían este intervalo. Células HEK293, que llevan endógenamente el receptor de RGM sobre su superficie, se transfectaron luego con estos fragmentos para preparar cultivos celulares clónicos que producen los fragmentos de proteína individuales y los liberan al medio de cultivo. Todos los fragmentos se produjeron como proteínas de fusión con la enzima adherida fosfatasa alcalina. La
45 presencia del dominio activo se hará notar en estas células mediante: menor proliferación celular, aumento de la muerte celular y/o adhesión célula-sustrato modificada (fijación).

El aumento de la muerte celular y la menor proliferación tienen naturalmente una repercusión directa sobre la cantidad producida de fragmento activo. La cantidad de fragmentos producidos se evaluó con la ayuda de una
50 prueba de transferencia puntual semicuantitativa.

b) Realización:

Los fragmentos de RGM-A preparados según el Ejemplo de preparación 1 se introdujeron en células HEK293. Las
55 células establemente transfectadas se cultivaron hasta confluencia en medio de cultivo (D-MEM (Gibco/Invitrogen 31966-021) 10 % de suero bovino fetal, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (ambos de Gibco/Invitrogen), 150 µg/ml de zeocina (Invitrogen). A continuación, cada 1 ml del sobrenadante de cultivo se filtró en una cámara de transferencia por ranuras a través de una membrana de nitrocelulosa (Sartorius). La proteína de fusión AP-RGM fijada sobre la membrana se detectó mediante la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina
60 mediante incubación de la membrana de nitrocelulosa con sustrato NBT/BCIP (Roche). La cantidad producida de fragmento activo se determinó con ayuda de una prueba de transferencia puntual semicuantitativa.

Basándose en esta prueba, los clones celulares estables se clasificaron en las siguientes categorías:

- clones celulares fuertemente productores (productor S)
- clones mediamente productores
- clones débilmente productores
- clones no productores (productor 0).

5

Además, se determinó la relación de los clones fuertemente con respecto a los no productores.

c) Resultado:

10 Para los fragmentos de RGM A probados individuales se determinaron los siguientes valores:

Fragmento (posiciones de aminoácidos)	Relación "productor S" frente a "productor 0"	Proporción de clones celulares fuertemente productores [%]
1 (169 - 238)	2,3	40
2 (218 - 284)	0,5	17
3 (266 - 335)	0,16	6,2
4 (316 - 386)	0,5	16
5 (369 - 422)	0,63	16
6 (168 - 422)	0,16	9

Especialmente los fragmentos 3 y 6 mostraron en esta prueba una excelente actividad.

15 **Ejemplo de realización 2:** Investigación de péptidos RGM A sintéticos en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas

Para este fin se sintetizaron los siguientes péptidos RGM A y se probaron a distintas concentraciones en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas anteriormente descrita (Método de prueba 1 y Método de prueba 2):

20

Péptido 1: aa 267-285

Péptido 2: aa 308-325

Péptido 3: aa 358-377

Péptido 4: aa 378-400

25

(Numeración referida a SEC ID N°:2)

De los péptidos probados hasta ahora, el péptido 1 fue fiable y reproducible de forma inhibidoramente activa. Por tanto, de esto puede deducirse que el péptido 1 (aa 267-285) es constituyente del dominio activo de la proteína RGM.

30

Los resultados de los experimentos se representan en las Figuras 3A, B, C y 4A, B.

La Figura 3A muestra que el péptido 1, a diferencia del péptido 4, inhibe significativamente el crecimiento de fibras nerviosas a una concentración de 10 µg/ml en experimentos con células neuronales de rata (Método de prueba 1).

35

La Figura 3B ilustra la acción de diferentes concentraciones (0 a 30 µg/ml) del péptido 1 sobre el crecimiento de fibras nerviosas de neuronas corticales. A partir de una concentración de más de 3 µg/ml puede detectarse una actividad inhibidora significativa. A diferencia de esto, el péptido de muestra 4 no muestra actividad bajo condiciones iguales (véase la Figura 3C) (NW-I = índice de crecimiento de neuronas, se corresponde con la superficie total del agregado neuronal con las neuronas correspondientes menos la superficie del agregado).

40

La Figura 4A muestra que el péptido 1, pero no el péptido 4, inhibe significativamente el crecimiento de fibras nerviosas de células NTERA humanas a una concentración de 30 µg/ml (Método de prueba 2). La Figura 4B ilustra la significancia estadística del efecto inhibidor observado del péptido 1.

45 **Ejemplo de realización 3:** Investigación de fragmentos de RGM A sintéticos en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas

Los seis distintos fragmentos de RGM A enumerados de nuevo a continuación, preparados según el Ejemplo de preparación 1, se probaron para la actividad inhibidora en la prueba de crecimiento de neuronas (véase el Método de prueba 2 anterior) con células nerviosas NTERA humanas.

50

Fragmento 1: aminoácidos 169 - 238

Fragmento 2: aminoácidos 218 - 284

Fragmento 3: aminoácidos 266 - 335

55

Fragmento 4: aminoácidos 316 - 386

Fragmento 5: aminoácidos 369 - 422

Fragmento 6: aminoácidos 168 - 422

(Numeración referida respectivamente a SEC ID N°:2)

Los resultados se resumen en las Figuras 5A, B y C adjuntas.

- 5 En la prueba de crecimiento de NTERA se probaron en total 6 fragmentos de RGM A distintos. Fueron activos los fragmentos 2, 3 y 6, fueron inactivos los fragmentos 1, 4 y 5.

10 El fragmento 6 se corresponde con la proteína RGM A completamente procesada activa, como también se describió *in vivo*. De estos datos se deduce que está localizado un importante dominio inhibidor del crecimiento de fibras nerviosas de la proteína RGM A humana en el intervalo de los fragmentos 2 y 3, es decir, entre los aminoácidos 218 y 335. Por tanto, para caracterizar con mayor precisión estos dominios inhibidores, en una etapa siguiente se probaron péptidos RGM A cortos de los intervalos de los fragmentos 2 y 3.

15 **Ejemplo de realización 4: Investigación de péptidos RGM A sintéticos en la prueba de crecimiento de fibras nerviosas**

Los péptidos representados en la siguiente tabla se probaron en la prueba de crecimiento de neuronas (véase el Método de prueba 2 anterior).

- 20 Tabla: Se sintetizaron péptidos RGM A contiguos del péptido 1 y se utilizan en la prueba de crecimiento de neuronas.

Péptido 1 (267 - 285)	GQHVEIQAKYIGTTIVVRQ (SEC ID N°:8)
Péptido Down-1 (260 - 275)	KITEKVSQGQHVEIQAK SEC ID N°:26)
Péptido Up-1 (276 - 291)	YIGTTIWRQVGRYLT (SEC ID N°:27)
Péptido 5-Ak (242 - 259)	AFVDGSKNGGDKHGANS (SEC ID N°:30)
Péptido 6-Ak (300 - 316)	VVNAVEDWDSQGLYLC (SEC ID N°:28)
Péptido 7-Ak (217 - 234)	TIIFKNFQECVDQKVYQA (SEC ID N°:29)

El péptido 1 ya se probó en el Ejemplo de realización 2.

- 25 Los resultados de los experimentos se representan en las Figuras 6A y B.

Tres de los péptidos RGM A probados condujeron en la prueba de crecimiento de NTERA a una fuerte reducción del crecimiento de fibras nerviosas (Fig. 6A). En el caso de estos péptidos RGM A activos se trató de los siguientes péptidos: péptido 1, péptido Down-1 y péptido Up-1. Los siguientes péptidos fueron inactivos o solo débilmente activos: Péptido 5-Ak, péptido 6-Ak y péptido 7-Ak (Fig. 6B). Es de suponer que uno de los dominios inhibidores de RGM A debe localizarse en el intervalo que está fijado por los 3 péptidos RGM A activos, es decir, el intervalo de la proteína RGM A humana que se extiende aproximadamente de 250 a 300, especialmente de aproximadamente 260 - 291, y, por tanto, comprende el intervalo central de la posición 267 a 285 (véase SEC ID N°: 7, 8). Debido a la actividad de ambos péptidos 6-Ak y 7-Ak, que a la mayor concentración de péptidos mostraron una tendencia a la inhibición del crecimiento (Fig. 6B), es absolutamente imaginable que RGM A todavía posea otros dominios inhibidores y, por tanto, los dominios en el intervalo de aproximadamente 210 - 260, así como aproximadamente 290 - 350, también son objeto de la invención.

40 **Ejemplo de realización 5: Neutralización del dominio inhibidor de RGM A con anticuerpos**

En este experimento se comprobará si los anticuerpos policlonales que se generaron contra péptidos activos del dominio inhibidor de RGM A están en situación de bloquear la interacción de RGM A con su receptor neogenina y de neutralizar *in vitro* la inhibición del crecimiento de fibras nerviosas del fragmento 2 de RGM A activo y más potente (véase el Ejemplo de realización 2).

45 Por tanto, a modo de ejemplo se usó el péptido Down-1, ya que es constituyente del fragmento 2 de RGM A activo. Acoplado a una proteína portadora (LPH), con este péptido se inmunizaron dos conejos según el siguiente esquema

Péptido	Cantidad de péptido	Animal	Primera inmunización	Refuerzo	Refuerzo	Refuerzo	Sangrado	Título
Down-1 800790	2,4 mg	8640 8641	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28	Día 35	1:150000 1:30000

Último refuerzo	Sangrado	Purificación
Día 56	20 ml 20 ml	24,9 mg en 22,5 ml 24,1 mg en 22 ml

Después de varias inmunizaciones, los anticuerpos específicos para Down-1 generados se purificaron y se utilizaron en distintos sistemas de prueba.

a) Prueba de unión de RGM A - neogenina:

La realización se realiza según el Método de prueba 3; los resultados de los experimentos se representan en la Figura 7A.

b) Neutralización del fragmento de RGM A activo en la prueba de crecimiento de neuritas:

El anticuerpo policlonal generado contra el péptido Down-1 bloqueó muy eficazmente la interacción de la proteína RGM A con su receptor neogenina. Por tanto, en la siguiente prueba se investigó si el anticuerpo específico para Down-1 estaba en situación de neutralizar el muy potente fragmento 2 de RGM A (véase el Ejemplo de realización 3).

La realización se realizó según el Método de prueba 2; los resultados de los experimentos se representan en la Figura 7B.

En resumen, los anticuerpos policlonales dirigidos contra el péptido Down-1 en la prueba de unión de RGM A - neogenina evitan la interacción de neogenina y RGM A y en la prueba de crecimiento de neuronas neutralizan casi completamente la actividad inhibidora del fragmento de RGM A. Por tanto, el intervalo entre los aminoácidos del extremo amino 250 y 300, especialmente 260 y 291, de la proteína RGM A es especialmente importante para su actividad inhibidora y mediante la presente se describe como nuevo dominio relevante funcional.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co. KG

<120> Dominios de unión a RGM

<130> M/46268-PCT

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1353

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1353)

<400> 1

ES 2 542 501 T3

atg	cag	ccg	cca	agg	gag	agg	cta	gtg	gta	aca	ggc	cga	gct	gga	tgg		48
Met	Gln	Pro	Pro	Arg	Glu	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Arg	Ala	Gly	Trp		
1				5					10					15			
atg	ggt	atg	ggg	aga	ggg	gca	gga	cgt	tca	gcc	ctg	gga	ttc	tgg	ccg		96
Met	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Ala	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Phe	Trp	Pro		
			20					25					30				
acc	ctc	gcc	ttc	ctt	ctc	tgc	agc	ttc	ccc	gca	gcc	acc	tcc	ccg	tgc		144
Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe	Pro	Ala	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys		
			35				40					45					
aag	atc	ctc	aag	tgc	aac	tct	gag	ttc	tgg	agc	gcc	acg	tcg	ggc	agc		192
Lys	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Ser	Glu	Phe	Trp	Ser	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser		
	50					55				60							
cac	gcc	cca	gcc	tca	gac	gac	acc	ccc	gag	ttc	tgt	gca	gcc	ttg	cgc		240
His	Ala	Pro	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Pro	Glu	Phe	Cys	Ala	Ala	Leu	Arg		
65					70					75				80			
agc	tac	gcc	ctg	tgc	acg	cgg	cgg	acg	gcc	cgc	acc	tgc	cgg	ggt	gac		288
Ser	Tyr	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr	Cys	Arg	Gly	Asp		
				85				90						95			
ctg	gcc	tac	cac	tcg	gcc	gtc	cat	ggc	ata	gag	gac	ctc	atg	agc	cag		336
Leu	Ala	Tyr	His	Ser	Ala	Val	His	Gly	Ile	Glu	Asp	Leu	Met	Ser	Gln		
			100					105						110			

cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca cgc ctg cgc acg	384
His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr	
115 120 125	
ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac agc ccc gag atc	432
Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile	
130 135 140	
tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc acc ccc aac tac	480
Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr	
145 150 155 160	
acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg act ttc acc gac	528
Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp	
165 170 175	
cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg ctc atc gac aat	576
Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn	
180 185 190	
aat tac ctg aac gtg cag gcc acc aac acg cct gtg ctg ccc ggc tca	624
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser	
195 200 205	
gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc cag	672
Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln	
210 215 220	
gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg gac gag ctc ccg	720
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro	
225 230 235 240	
gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac aag cac ggg gcc	768
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala	
245 250 255	
aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc	816
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile	
260 265 270	
cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc cag gtg ggc cgc	864
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg	
275 280 285	
tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg gtc aat gct gtg	912
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val	
290 295 300	
gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccc	960

Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro	
305	310 315 320
ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc aat gct gag ggc	1008
Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly	
325 330 335	
acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca ccc aca gcc ccc	1056
Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro	
340 345 350	
gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc aag gag aag ctg	1104
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu	
355 360 365	
ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc gac ctc ctc acc	1152
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr	
370 375 380	
acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac gcg ttg gag gat	1200
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp	
385 390 395 400	
gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac ctg tat gag agg	1248
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg	
405 410 415	
act cgg gac ctg cca ggc agg gcg gct gcg ggg ctg ccc ctg gcc ccc	1296
Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro	
420 425 430	
cgg ccc ctc ctg ggc gcc ctc gtc ccg ctc ctg gcc ctg ctc cct gtg	1344
Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val	
435 440 445	
ttc tgc tag	1353
Phe Cys	
450	

<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1 5 10 15

ES 2 542 501 T3

Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
20 25 30

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

Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
50 55 60

His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
65 70 75 80

Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
85 90 95

Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
100 105 110

His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
130 135 140

Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
145 150 155 160

Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
165 170 175

Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190

Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser
195 200 205

Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln

ES 2 542 501 T3

210	215	220
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro		
225	230	235 240
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala		
	245	250 255
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile		
	260	265 270
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg		
	275	280 285
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val		
	290	295 300
Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro		
305	310	315 320
Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly		
	325	330 335
Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro		
	340	345 350
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu		
	355	360 365
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr		
	370	375 380
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp		
385	390	395 400
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg		
	405	410 415

Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
420 425 430

Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
435 440 445

Phe Cys
450

<210> 3
<211> 1437
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1437)

<400> 3

atg ata agg aag aag agg aag cga agc gcg ccc ccc ggc cca tgc cgc 48
Met Ile Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Ala Pro Pro Gly Pro Cys Arg
1 5 10 15

agc cac ggg ccc aga ccc gcc acg gcg ccc gcg ccg ccg ccc tcg ccg 96
Ser His Gly Pro Arg Pro Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Ser Pro
20 25 30

gag ccc acg aga cct gca tgg acg ggc atg ggc ttg aga gca gca cct 144
Glu Pro Thr Arg Pro Ala Trp Thr Gly Met Gly Leu Arg Ala Ala Pro
35 40 45

tcc agc gcc gcc gct gcc gcc gcc gag gtt gag cag cgc cgc cgc ccc 192
Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Val Glu Gln Arg Arg Arg Pro
50 55 60

ggg ctc tgc ccc ccg ccg ctg gag ctg ctg ctg ctg ctg ttc agc 240
Gly Leu Cys Pro Pro Pro Leu Glu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Ser
65 70 75 80

ctc ggg ctg ctc cac gca ggt gac tgc caa cag cca gcc caa tgt cga 288
Leu Gly Leu Leu His Ala Gly Asp Cys Gln Gln Pro Ala Gln Cys Arg
85 90 95

atc cag aaa tgc acc acg gac ttc gtg tcc ctg act tct cac ctg aac 336
Ile Gln Lys Cys Thr Thr Asp Phe Val Ser Leu Thr Ser His Leu Asn

ES 2 542 501 T3

100	105	110	
tct gcc gtt gac ggc ttt gac tct gag ttt tgc aag gcc ttg cgt gcc			384
Ser Ala Val Asp Gly Phe Asp Ser Glu Phe Cys Lys Ala Leu Arg Ala			
115	120	125	
tat gct ggc tgc acc cag cga act tca aaa gcc tgc cgt ggc aac ctg			432
Tyr Ala Gly Cys Thr Gln Arg Thr Ser Lys Ala Cys Arg Gly Asn Leu			
130	135	140	
gta tac cat tct gcc gtg ttg ggt atc agt gac ctc atg agc cag agg			480
Val Tyr His Ser Ala Val Leu Gly Ile Ser Asp Leu Met Ser Gln Arg			
145	150	155	160
aat tgt tcc aag gat gga ccc aca tcc tct acc aac ccc gaa gtg acc			528
Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Ser Thr Asn Pro Glu Val Thr			
165	170	175	
cat gat cct tgc aac tat cac agc cac gct gga gcc agg gaa cac agg			576
His Asp Pro Cys Asn Tyr His Ser His Ala Gly Ala Arg Glu His Arg			
180	185	190	
aga ggg gac cag aac cct ccc agt tac ctt ttt tgt ggc ttg ttt gga			624
Arg Gly Asp Gln Asn Pro Pro Ser Tyr Leu Phe Cys Gly Leu Phe Gly			
195	200	205	
gat cct cac ctc aga act ttc aag gat aac ttc caa aca tgc aaa gta			672
Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Lys Asp Asn Phe Gln Thr Cys Lys Val			
210	215	220	
gaa ggg gcc tgg cca ctc ata gat aat aat tat ctt tca gtt caa gtg			720
Glu Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Ser Val Gln Val			
225	230	235	240
aca aac gta cct gtg gtc cct gga tcc agt gct act gct aca aat aag			768
Thr Asn Val Pro Val Val Pro Gly Ser Ser Ala Thr Ala Thr Asn Lys			
245	250	255	
atc act att atc ttc aaa gcc cac cat gag tgt aca gat cag aaa gtc			816
Ile Thr Ile Ile Phe Lys Ala His His Glu Cys Thr Asp Gln Lys Val			
260	265	270	
tac caa gct gtg aca gat gac ctg ccg gcc gcc ttt gtg gat ggc acc			864
Tyr Gln Ala Val Thr Asp Asp Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Thr			
275	280	285	
acc agt ggt ggg gac agc gat gcc aag agc ctg cgt atc gtg gaa agg			912
Thr Ser Gly Gly Asp Ser Asp Ala Lys Ser Leu Arg Ile Val Glu Arg			
290	295	300	

gag agt ggc cac tat gtg gag atg cac gcc cgc tat ata ggg acc aca	960
Glu Ser Gly His Tyr Val Glu Met His Ala Arg Tyr Ile Gly Thr Thr	
305 310 315 320	
gtg ttt gtg cgg cag gtg ggt cgc tac ctg acc ctt gcc atc cgt atg	1008
Val Phe Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Leu Ala Ile Arg Met	
325 330 335	
cct gaa gac ctg gcc atg tcc tac gag gag agc cag gac ctg cag ctg	1056
Pro Glu Asp Leu Ala Met Ser Tyr Glu Glu Ser Gln Asp Leu Gln Leu	
340 345 350	
tgc gtg aac ggc tgc ccc ctg agt gaa cgc atc gat gac ggg cag ggc	1104
Cys Val Asn Gly Cys Pro Leu Ser Glu Arg Ile Asp Asp Gly Gln Gly	
355 360 365	
cag gtg tct gcc atc ctg gga cac agc ctg cct cgc acc tcc ttg gtg	1152
Gln Val Ser Ala Ile Leu Gly His Ser Leu Pro Arg Thr Ser Leu Val	
370 375 380	
cag gcc tgg cct ggc tac aca ctg gag act gcc aac act caa tgc cat	1200
Gln Ala Trp Pro Gly Tyr Thr Leu Glu Thr Ala Asn Thr Gln Cys His	
385 390 395 400	
gag aag atg cca gtg aag gac atc tat ttc cag tcc tgt gtc ttc gac	1248
Glu Lys Met Pro Val Lys Asp Ile Tyr Phe Gln Ser Cys Val Phe Asp	
405 410 415	
ctg ctc acc act ggt gat gcc aac ttt act gcc gca gcc cac agt gcc	1296
Leu Leu Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Thr Ala Ala Ala His Ser Ala	
420 425 430	
ttg gag gat gtg gag gcc ctg cac cca agg aag gaa cgc tgg cac att	1344
Leu Glu Asp Val Glu Ala Leu His Pro Arg Lys Glu Arg Trp His Ile	
435 440 445	
ttc ccc agc agt ggc aat ggg act ccc cgt gga ggc agt gat ttg tct	1392
Phe Pro Ser Ser Gly Asn Gly Thr Pro Arg Gly Gly Ser Asp Leu Ser	
450 455 460	
gtc agt cta gga ctc acc tgc ttg atc ctt atc gtg ttt ttg tag	1437
Val Ser Leu Gly Leu Thr Cys Leu Ile Leu Ile Val Phe Leu	
465 470 475	

<210> 4
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 542 501 T3

Met Ile Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Ala Pro Pro Gly Pro Cys Arg
1 5 10 15

Ser His Gly Pro Arg Pro Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ser Pro
20 25 30

Glu Pro Thr Arg Pro Ala Trp Thr Gly Met Gly Leu Arg Ala Ala Pro
35 40 45

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Val Glu Gln Arg Arg Arg Pro
50 55 60

Gly Leu Cys Pro Pro Pro Leu Glu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Ser
65 70 75 80

Leu Gly Leu Leu His Ala Gly Asp Cys Gln Gln Pro Ala Gln Cys Arg
85 90 95

Ile Gln Lys Cys Thr Thr Asp Phe Val Ser Leu Thr Ser His Leu Asn
100 105 110

Ser Ala Val Asp Gly Phe Asp Ser Glu Phe Cys Lys Ala Leu Arg Ala
115 120 125

Tyr Ala Gly Cys Thr Gln Arg Thr Ser Lys Ala Cys Arg Gly Asn Leu
130 135 140

Val Tyr His Ser Ala Val Leu Gly Ile Ser Asp Leu Met Ser Gln Arg
145 150 155 160

Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Ser Thr Asn Pro Glu Val Thr
165 170 175

His Asp Pro Cys Asn Tyr His Ser His Ala Gly Ala Arg Glu His Arg
180 185 190

Arg Gly Asp Gln Asn Pro Pro Ser Tyr Leu Phe Cys Gly Leu Phe Gly
195 200 205

Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Lys Asp Asn Phe Gln Thr Cys Lys Val
210 215 220

Glu Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Ser Val Gln Val
225 230 235 240

Thr Asn Val Pro Val Val Pro Gly Ser Ser Ala Thr Ala Thr Asn Lys
245 250 255

Ile Thr Ile Ile Phe Lys Ala His His Glu Cys Thr Asp Gln Lys Val
260 265 270

Tyr Gln Ala Val Thr Asp Asp Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Thr
275 280 285

Thr Ser Gly Gly Asp Ser Asp Ala Lys Ser Leu Arg Ile Val Glu Arg
290 295 300

Glu Ser Gly His Tyr Val Glu Met His Ala Arg Tyr Ile Gly Thr Thr
305 310 315 320

Val Phe Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Leu Ala Ile Arg Met
325 330 335

Pro Glu Asp Leu Ala Met Ser Tyr Glu Glu Ser Gln Asp Leu Gln Leu
340 345 350

Cys Val Asn Gly Cys Pro Leu Ser Glu Arg Ile Asp Asp Gly Gln Gly
355 360 365

Gln Val Ser Ala Ile Leu Gly His Ser Leu Pro Arg Thr Ser Leu Val
370 375 380

Gln Ala Trp Pro Gly Tyr Thr Leu Glu Thr Ala Asn Thr Gln Cys His
385 390 395 400

Glu Lys Met Pro Val Lys Asp Ile Tyr Phe Gln Ser Cys Val Phe Asp
405 410 415

Leu Leu Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Thr Ala Ala Ala His Ser Ala
420 425 430

Leu Glu Asp Val Glu Ala Leu His Pro Arg Lys Glu Arg Trp His Ile
435 440 445

Phe Pro Ser Ser Gly Asn Gly Thr Pro Arg Gly Gly Ser Asp Leu Ser
450 455 460

Val Ser Leu Gly Leu Thr Cys Leu Ile Leu Ile Val Phe Leu
465 470 475

<210> 5
<211> 1281
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1281)

<400> 5

atg ggg gag cca ggc cag tcc cct agt ccc agg tcc tcc cat ggc agt 48
Met Gly Glu Pro Gly Gln Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ser His Gly Ser
1 5 10 15

ccc cca act cta agc act ctc act ctc ctg ctg ctc ctc tgt gga cat 96
Pro Pro Thr Leu Ser Thr Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Cys Gly His
20 25 30

gct cat tct caa tgc aag atc ctc cgc tgc aat gct gag tac gta tcg 144
Ala His Ser Gln Cys Lys Ile Leu Arg Cys Asn Ala Glu Tyr Val Ser
35 40 45

tcc act ctg agc ctt aga ggt ggg ggt tca tca gga gca ctt cga gga 192
Ser Thr Leu Ser Leu Arg Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ala Leu Arg Gly
50 55 60

gga gga gga gga ggc cgg ggt gga ggg gtg ggc tct ggc ggc ctc tgt 240

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Val Gly Ser Gly Gly Leu Cys	
65 70 75 80	
cga gcc ctc cgc tcc tat gcg ctg tgc act cgg cgc acc gcc cgc acc	288
Arg Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr	
85 90 95	
tgc cgc ggg gac ctc gcc ttg cat tcg gcg gta cat ggc atc gaa gac	336
Cys Arg Gly Asp Leu Ala Phe His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp	
100 105 110	
ctg atg atc cag cac aac tgc tcc cgc cag ggc cct aca gcc cct ccc	384
Leu Met Ile Gln His Asn Cys Ser Arg Gln Gly Pro Thr Ala Pro Pro	
115 120 125	
ccg ccc cgg ggc ccc gcc ctt cca ggc gcg ggc tcc ggc ctc cct gcc	432
Pro Pro Arg Gly Pro Ala Leu Pro Gly Ala Gly Ser Gly Leu Pro Ala	
130 135 140	
ccg gac cct tgt gac tat gaa ggc cgg ttt tcc cgg ctg cat ggt cgt	480
Pro Asp Pro Cys Asp Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Arg Leu His Gly Arg	
145 150 155 160	
ccc ccg ggg ttc ttg cat tgc gct tcc ttc ggg gac ccc cat gtg cgc	528
Pro Pro Gly Phe Leu His Cys Ala Ser Phe Gly Asp Pro His Val Arg	
165 170 175	
agc ttc cac cat cac ttt cac aca tgc cgt gtc caa gga gct tgg cct	576
Ser Phe His His His Phe His Thr Cys Arg Val Gln Gly Ala Trp Pro	
180 185 190	
cta ctg gat aat gac ttc ctc ttt gtc caa gcc acc agc tcc ccc atg	624
Leu Leu Asp Asn Asp Phe Leu Phe Val Gln Ala Thr Ser Ser Pro Met	
195 200 205	
gcg ttg ggg gcc aac gct acc gcc acc cgg aag ctc acc atc ata ttt	672
Ala Leu Gly Ala Asn Ala Thr Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ile Ile Phe	
210 215 220	
aag aac atg cag gaa tgc att gat cag aag gtg tat cag gct gag gtg	720
Lys Asn Met Gln Glu Cys Ile Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Val	
225 230 235 240	
gat aat ctt cct gta gcc ttt gaa gat ggt tct atc aat gga ggt gac	768
Asp Asn Leu Pro Val Ala Phe Glu Asp Gly Ser Ile Asn Gly Gly Asp	
245 250 255	
cga cct ggg gga tcc agt ttg tcg att caa act gct aac cct ggg aac	816
Arg Pro Gly Gly Ser Ser Leu Ser Ile Gln Thr Ala Asn Pro Gly Asn	
260 265 270	

```

cat gtg gag atc caa gct gcc tac att ggc aca act ata atc att cgg      864
His Val Glu Ile Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg
      275                      280                      285

cag aca gct ggg cag ctc tcc ttc tcc atc aag gta gca gag gat gtg      912
Gln Thr Ala Gly Gln Leu Ser Phe Ser Ile Lys Val Ala Glu Asp Val
      290                      295                      300

gcc atg gcc ttc tca gct gaa cag gac ctg cag ctc tgt gtt ggg ggg      960
Ala Met Ala Phe Ser Ala Glu Gln Asp Leu Gln Leu Cys Val Gly Gly
      305                      310                      315                      320

tgc cct cca agt cag cga ctc tct cga tca gag cgc aat cgt cgg gga      1008
Cys Pro Pro Ser Gln Arg Leu Ser Arg Ser Glu Arg Asn Arg Arg Gly
      325                      330                      335

gct ata acc att gat act gcc aga cgg ctg tgc aag gaa ggg ctt cca      1056
Ala Ile Thr Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Cys Lys Glu Gly Leu Pro
      340                      345                      350

gtg gaa gat gct tac ttc cat tcc tgt gtc ttt gat gtt tta att tct      1104
Val Glu Asp Ala Tyr Phe His Ser Cys Val Phe Asp Val Leu Ile Ser
      355                      360                      365

ggg gat ccc aac ttt acc gtg gca gct cag gca gca ctg gag gat gcc      1152
Gly Asp Pro Asn Phe Thr Val Ala Ala Gln Ala Ala Leu Glu Asp Ala
      370                      375                      380

cga gcc ttc ctg cca gac tta gag aag ctg cat ctc ttc ccc tca gat      1200
Arg Ala Phe Leu Pro Asp Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Pro Ser Asp
      385                      390                      395                      400

gct ggg gtt cct ctt tcc tca gca acc ctc tta gct cca ctc ctt tct      1248
Ala Gly Val Pro Leu Ser Ser Ala Thr Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser
      405                      410                      415

ggg ctc ttt gtt ctg tgg ctt tgc att cag taa      1281
Gly Leu Phe Val Leu Trp Leu Cys Ile Gln
      420                      425

```

<210> 6
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met Gly Glu Pro Gly Gln Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ser His Gly Ser

ES 2 542 501 T3

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

ES 2 542 501 T3

Ala Leu Gly Ala Asn Ala Thr Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ile Ile Phe
210 215 220

Lys Asn Met Gln Glu Cys Ile Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Val
225 230 235 240

Asp Asn Leu Pro Val Ala Phe Glu Asp Gly Ser Ile Asn Gly Gly Asp
245 250 255

Arg Pro Gly Gly Ser Ser Leu Ser Ile Gln Thr Ala Asn Pro Gly Asn
260 265 270

His Val Glu Ile Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg
275 280 285

Gln Thr Ala Gly Gln Leu Ser Phe Ser Ile Lys Val Ala Glu Asp Val
290 295 300

Ala Met Ala Phe Ser Ala Glu Gln Asp Leu Gln Leu Cys Val Gly Gly
305 310 315 320

Cys Pro Pro Ser Gln Arg Leu Ser Arg Ser Glu Arg Asn Arg Arg Gly
325 330 335

Ala Ile Thr Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Cys Lys Glu Gly Leu Pro
340 345 350

Val Glu Asp Ala Tyr Phe His Ser Cys Val Phe Asp Val Leu Ile Ser
355 360 365

Gly Asp Pro Asn Phe Thr Val Ala Ala Gln Ala Ala Leu Glu Asp Ala
370 375 380

Arg Ala Phe Leu Pro Asp Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ala Gly Val Pro Leu Ser Ser Ala Thr Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser

405

410

415

Gly Leu Phe Val Leu Trp Leu Cys Ile Gln
420 425

5 <210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Consenso

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(7)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(17)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 7

Gly Xaa Xaa Val Glu Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Ile Gly Thr Thr Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Arg Gln

35 <210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido de dominio de unión

<400> 8

Gly Gln His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val
1 5 10 15

45 Val Arg Gln

<210> 9
<211> 19

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 9

 Gly His Tyr Val Glu Met His Ala Arg Tyr Ile Gly Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15

 Val Arg Gln
 10
 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 10
 20
 Gly Asn His Val Glu Ile Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile
 1 5 10 15

 Ile Arg Gln

 <210> 11
 <211> 79
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR
 30
 <400> 11

 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggccccaca 60

 cctcaggact ttcaccgac 79

 35 <210> 12
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 12
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ctgtccatc tcagcctggt acacc 55
 45
 <210> 13
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50

ES 2 542 501 T3

	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 13		
5			
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggcccatcat	60	
	cttcaagaac ttccaggagt gtg	83	
	<210> 14		
	<211> 49		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
15			
	<400> 14		
	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg gcgcaccacg atggtggtg	49	
	<210> 15		
20	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador de PCR		
	<400> 15		
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggccctcagg	60	
	ccagcacgtg gagatcc	77	
30			
	<210> 16		
	<211> 52		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35			
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 16		
40	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctgagcattg gtgtggaagg cc	52	
	<210> 17		
	<211> 73		
	<212> ADN		
45	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
50			
	<400> 17		
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggcccctgcg	60	
	gggctgcccc etc	73	
	<210> 18		
55	<211> 49		
	<212> ADN		

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 5
 <400> 18
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc gcccggtgtg aggaggctg 49
 <210> 19
 10 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador de PCR
 <400> 19
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggccccctgcc 60
 ggtggaggac ctgtac 76
 20
 <210> 20
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 20
 30 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt gcctggcagg tcccagatc 49
 <210> 21
 <211> 79
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 40 <400> 21
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt tctggaagtt ctgttccagg ggccccccaca 60
 cctcaggact ttcaccgac 79
 <210> 22
 45 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de PCR
 <400> 22
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt gcctggcagg tcccagatc 49
 55
 <210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de dominio de unión

<400> 23

5

Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln Ala Lys
1 5 10 15

Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr
20 25 30

<210> 24

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de dominio de unión

15

<400> 24

Arg Ile Val Glu Arg Glu Ser Gly His Tyr Val Glu Met His Ala Arg
1 5 10 15

Tyr Ile Gly Thr Thr Val Phe Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr
20 25 30

20

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido de dominio de unión

<400> 25

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

Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg Gln Thr Ala Gly Gln Leu Ser
20 25 30

30

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de dominio de unión

40

<400> 26

Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln Ala Lys
1 5 10 15

5 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 10 <400> 27

 Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

 15 <210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 28

 Val Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys
 1 5 10 15

 25 <210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 29

 Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr
 1 5 10 15

 Gln Ala

 35 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 30

 45 <210> 31
 <211> 16

 Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn
 1 5 10 15

 Ser Leu

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 31

 Arg Ile Val Glu Arg Glu Ser Gly His Tyr Val Glu Met His Ala Arg
 1 5 10 15

 10
 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 32

 20 Tyr Ile Gly Thr Thr Val Phe Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

 <210> 33
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido de dominio de unión
 30
 <400> 33

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

 35
 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40
 <220>
 <223> péptido de dominio de unión

 <400> 34

 45 Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg Gln Thr Ala Gly Gln Leu Ser
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

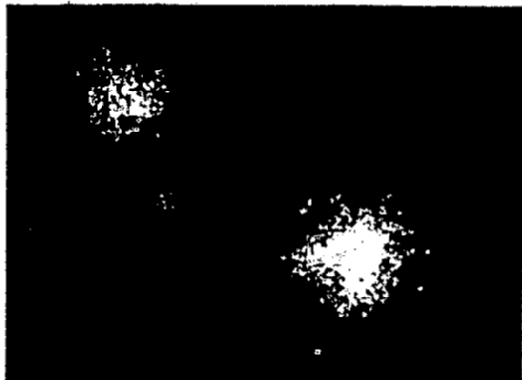
1. Dominio de unión al receptor de neogenina de la molécula de orientación repulsiva (RGM) con una secuencia de aminoácidos
 - 5 de la posición de aminoácidos 200 a 350 según SEC ID N°: 2,
 - de la posición de aminoácidos 200 a 325 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 200 a 300 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 200 a 285 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 250 a 285 según SEC ID N°: 2, o
 - 10 de la posición de aminoácidos 260 a 285 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 215 a 340 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 260 a 340 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 250 a 300 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 260 a 291 según SEC ID N°: 2, o
 - 15 de la posición de aminoácidos 210 a 260 según SEC ID N°: 2, o
 - de la posición de aminoácidos 290 a 350 según SEC ID N°: 2, o
 un fragmento de unión al receptor de neogenina funcional del mismo con una longitud de 10-30 restos de aminoácidos consecutivos, o equivalente de unión al receptor de neogenina funcional del mismo con una homología de secuencias de por lo menos el 75 %.
- 20 2. Dominio de unión al receptor de neogenina con una secuencia de aminoácidos según la región de secuencia de la posición 260 a 291 ó 267 a 285 según SEC ID N°: 2, o la región de secuencia de la posición 260 a 325 según SEC ID N°: 4 o la región de secuencia de la posición 250 a 300 según SEC ID N°: 6; o fragmento de unión al receptor de neogenina
 - 25 del mismo, que presenta por lo menos 10 restos de aminoácidos adyacentes del mismo.
3. Fragmento de polipéptido antigénico del dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el fragmento antigénico presenta por lo menos 10 restos de aminoácidos contiguos del dominio.
 - 30 4. Fragmento de polipéptido antigénico según la reivindicación 3, que es útil para la preparación de moléculas de inmunoglobulina que modulan la unión de RGM al receptor de neogenina.
5. Fragmento de polipéptido antigénico según la reivindicación 3, que comprende por lo menos 10 restos de aminoácidos contiguos de un péptido con una de las secuencias según SEC ID N°: 7, 8, 9, 10 ó 23 a 29 ó 31 a 34.
 - 35 6. Uso de un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5 para la preparación de un antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal contra RGM.
- 40 7. Uso según la reivindicación 6, en el que el antisuero o el anticuerpo modula la unión de RGM al receptor de neogenina.
8. Antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal contra RGM según la definición en una de las reivindicaciones 6 y 7
 - 45 para su uso en el diagnóstico o terapia.
9. Uso de un antisuero policlonal o de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 8 para la preparación de un producto farmacéutico para el diagnóstico o terapia de enfermedades o estadios de enfermedad que están mediados por una interacción del receptor de neogenina con RGM o un fragmento de RGM.
 - 50 10. Uso según la reivindicación 9, en el que las enfermedades o estadios de enfermedad están seleccionados de
 - a) lesiones mecánicas del cráneo, cerebro y médula espinal,
 - b) enfermedades crónicas, seleccionadas de entre enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias o
 - 55 autoinmunitarias,
 - c) trastornos de la regeneración neuronal, del brote axónico, de la extensión de neuronas y de la plasticidad neuronal,
 - d) enfermedades tumorales y metastatización tumoral.
- 60 11. Uso de un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5 para la preparación de un agente para el diagnóstico o terapia de enfermedades o estadios de enfermedad que están mediados por una interacción alterada o perjudicada de RGM o un fragmento de RGM con el receptor correspondiente.
- 65 12. Uso según la reivindicación 11, en el que las enfermedades o estadios de enfermedad están seleccionados de entre

- a) procesos de neuritogénesis modificados en enfermedades psicóticas y estados de dolor crónico que son provocados por la excesiva formación de brotes de neuronas y/o sinaptogénesis patológica
b) enfermedades asociadas a un metabolismo del hierro alterado;
c) enfermedades asociadas a un crecimiento óseo alterado
5 d) enfermedades asociadas a modificaciones degenerativas del cartílago
e) enfermedades asociadas a lesiones discales y de los cuerpos vertebrales
f) enfermedades asociadas a procesos de migración celular desregulados incontrolados.
- 10 13. Dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5 para su uso como diana para la detección o para la identificación de ligandos que se unen a RGM.
- 15 14. Dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5 para su uso como inmunogén para inmunización activa o pasiva.
- 15 15. Antisuero policlonal que puede obtenerse mediante la inmunización de un mamífero con una cantidad antigénica de un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5.
- 20 16. Anticuerpo monoclonal contra un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o contra un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5, o un fragmento que se une al antígeno del mismo, dado el caso en forma humanizada.
- 25 17. Producto farmacéutico que comprende en un vehículo farmacéuticamente compatible por lo menos un constituyente activo seleccionado de entre:
- a) un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5,
b) anticuerpos monoclonales o policlonales según una de las reivindicaciones 15 y 16.
- 30 18. Producto farmacéutico según la reivindicación 17 para administración intratecal, intravenosa, subcutánea, oral o parenteral, nasal y por inhalación.
- 35 19. Vector de expresión, que comprende por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5, operativamente ligado con por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos reguladora.
- 40 20. Microorganismo recombinante que lleva por lo menos un vector según la reivindicación 19.
- 40 21. Línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 16.
- 45 22. Procedimiento para la preparación de un dominio de unión al receptor de neogenina según una de las reivindicaciones 1 y 2 o de un fragmento de polipéptido según una de las reivindicaciones 3 a 5, en el que se cultiva un microorganismo recombinante según la reivindicación 20 y el producto de proteína producido se aísla del cultivo.
- 45 23. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 16, en el que se cultiva una línea celular de hibridoma según la reivindicación 21 y el producto de proteína producido se aísla del cultivo.

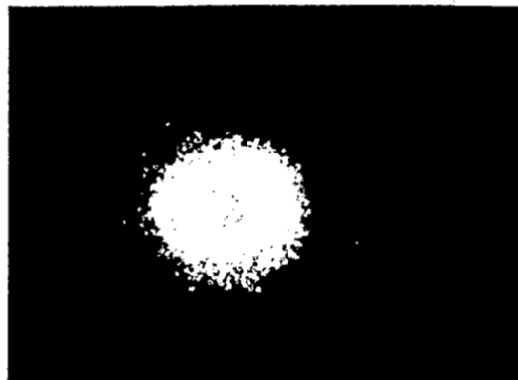
N					C			
Péptido señal		R G D		vWFD		Región hidrófoba		Anclaje de GPI
1	47	94 – 96	163	222		376	397	425 450

59

Control de PBS



Control de tampón



Pép. 4



Pép. 1



Fig. 3A

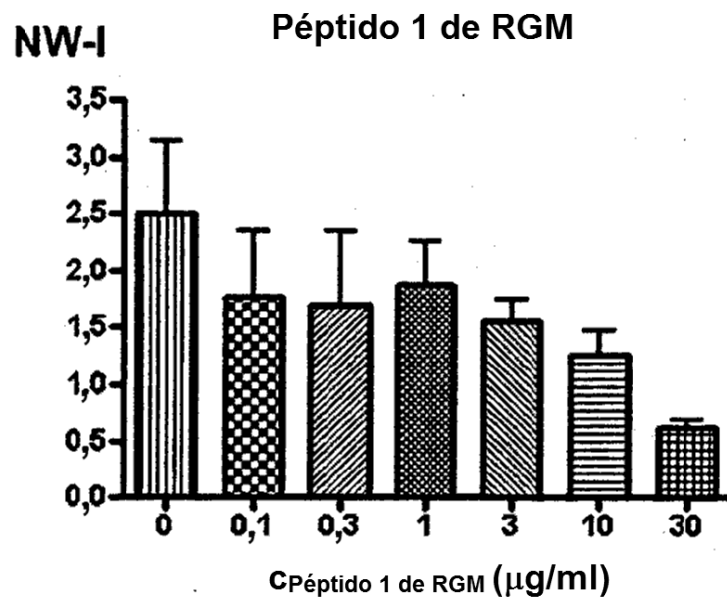


Fig. 3B

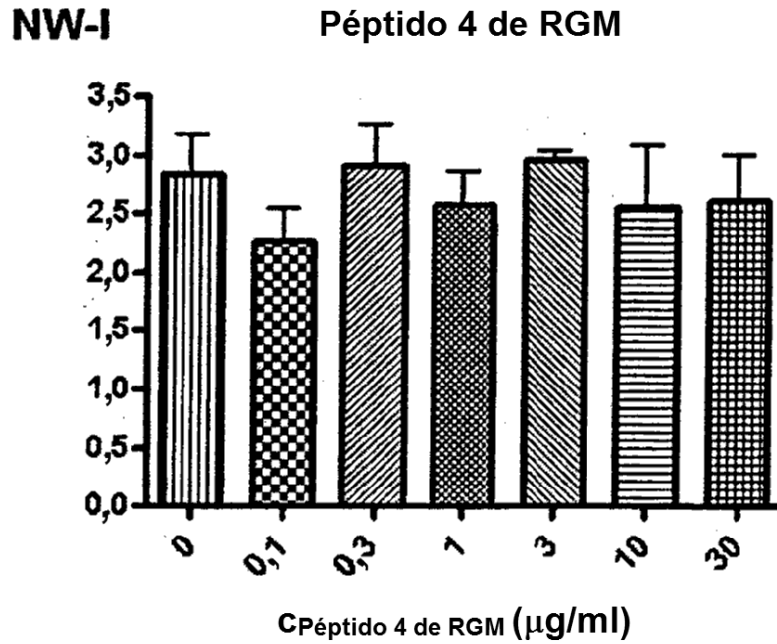
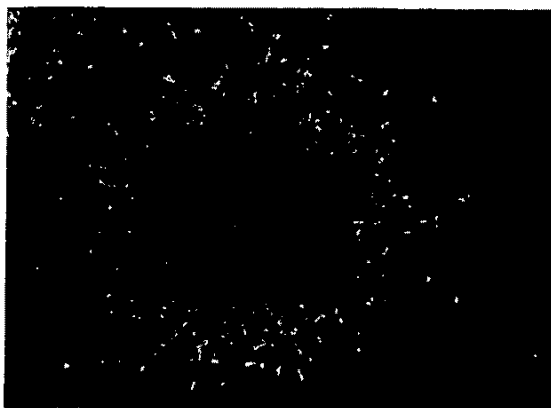


Fig. 3C

+ Péptido 1 (30 µg/ml)



+ Péptido 4 (30 µg/ml)



+ PBS (control)

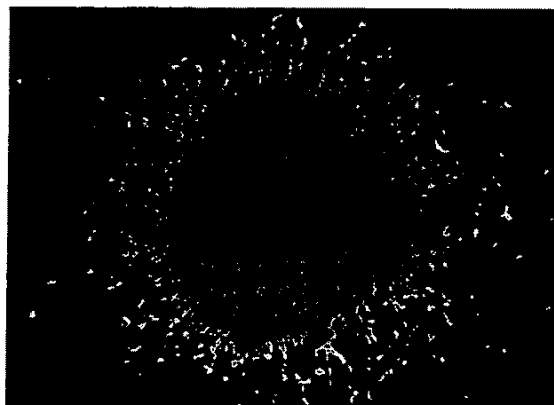
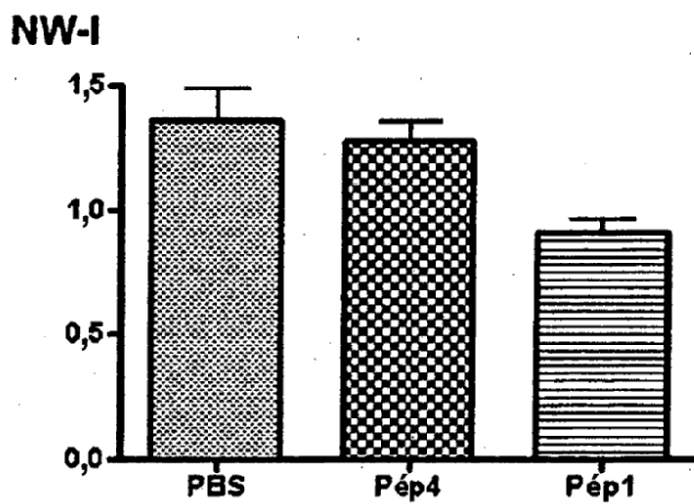
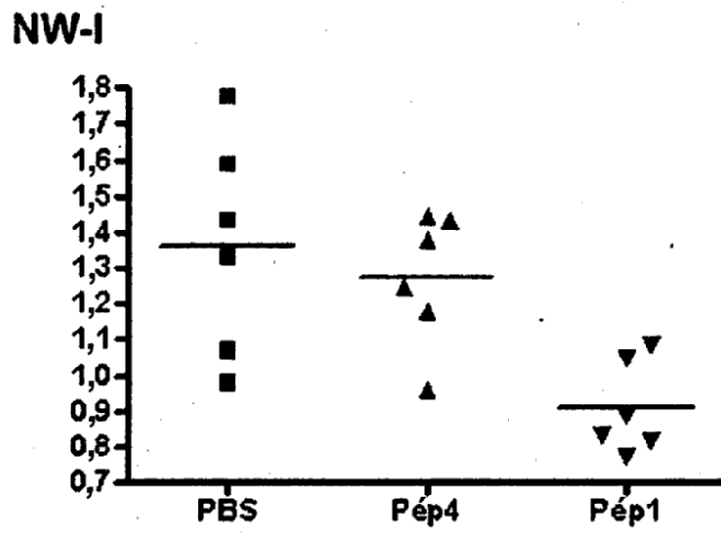


Fig. 4A



P  p. 1 frente a PBS: $p < 0,01$
 P  p. 1 frente a P  p. 4: $p < 0,05$
 P  p. 4 frente a PBS: $p > 0,05$

Fig. 4B

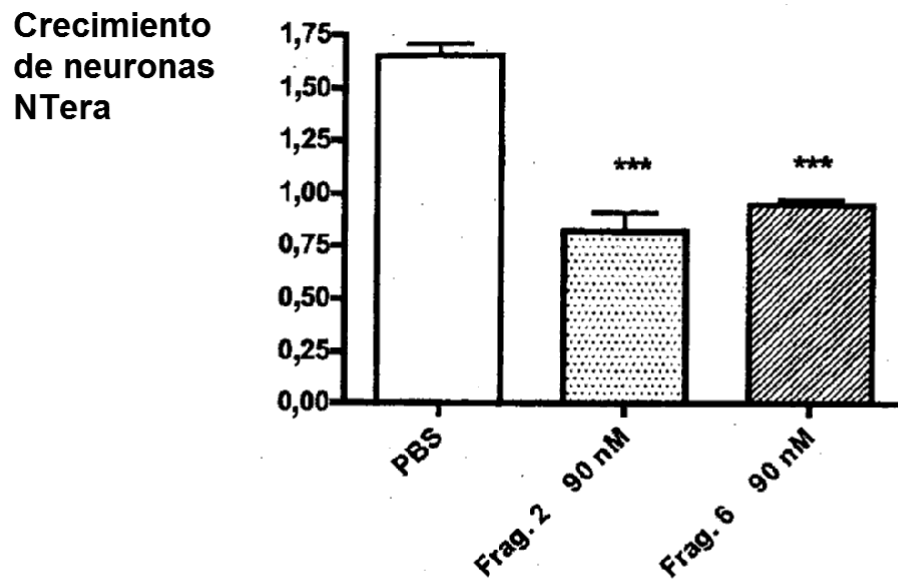


Fig. 5A

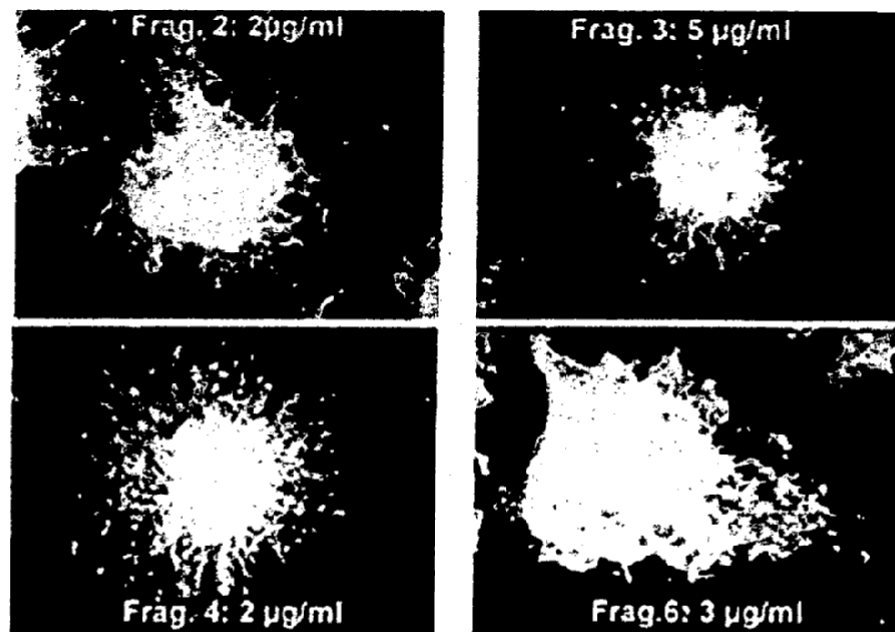


Fig. 5B

Crecimiento
de neuronas
NTera

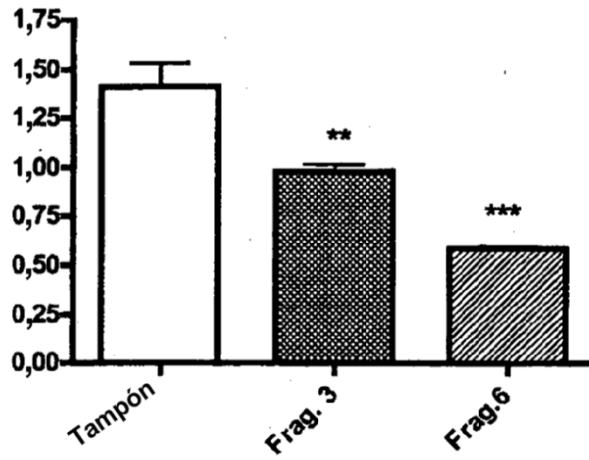
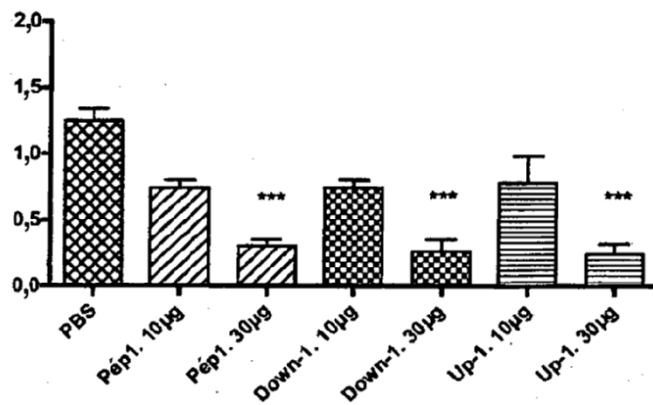


Fig. 5C

Crecimiento
de neuronas
NTera



*** = $p < 0,001$ Significación frente al control de PBS

Fig. 6A

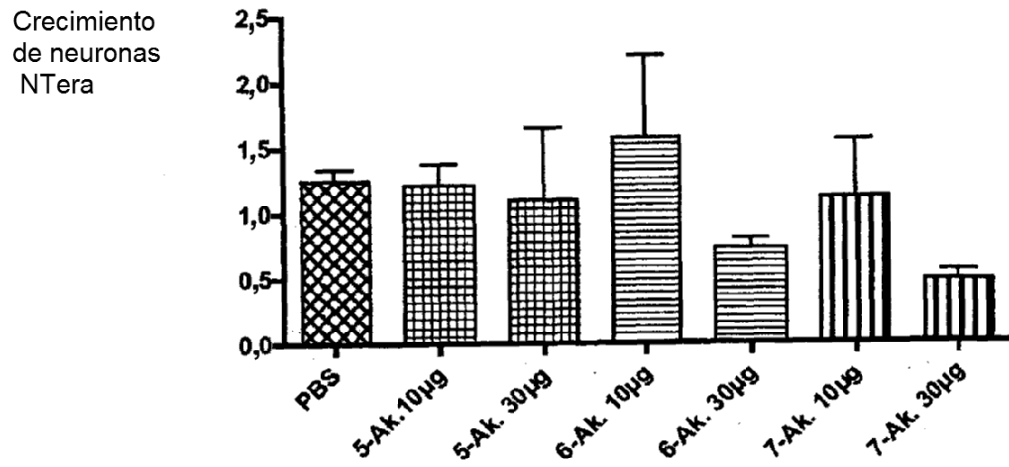


Fig. 6B

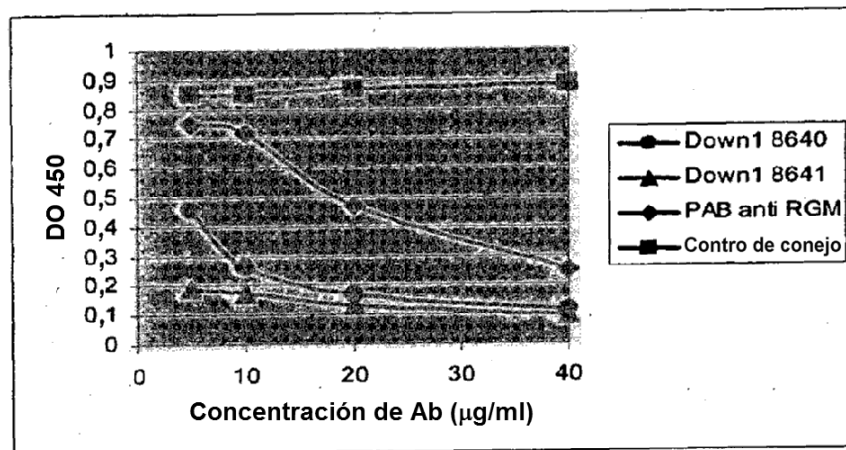


Fig. 7A

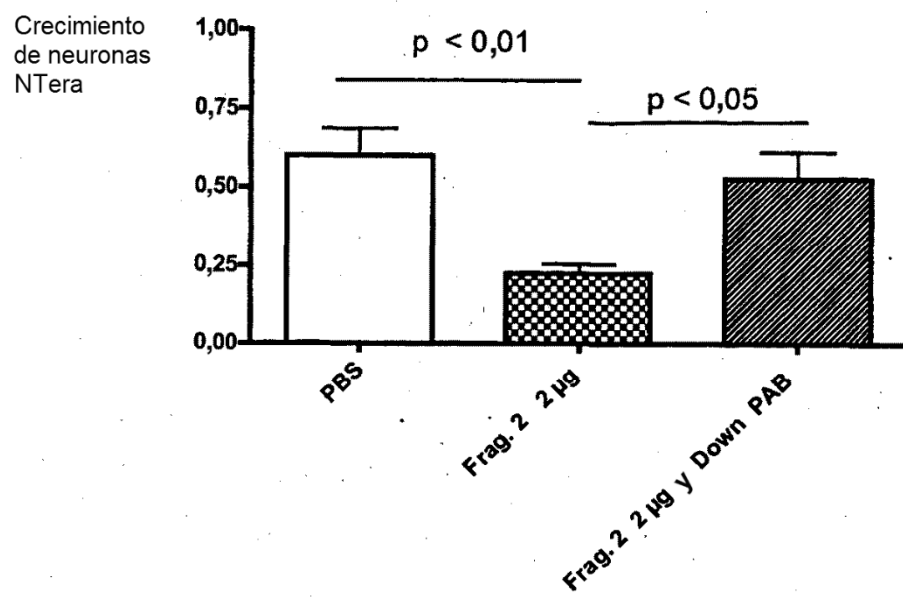


Fig. 7B