

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 959**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09715176 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2260055**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la proteína RGM A y usos de los mismos**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 32707 P

21.08.2008 US 90743 P

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

03.11.2015

73 Titular/es:

ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)
Max-Planck-Ring 2a
65205 Wiesbaden, DE y
ABBVIE INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MÜLLER, BERNHARD K.;
SCHMIDT, MARTIN;
BARLOW, EVE H.;
LEDDY, MARY R.;
HSIEH, CHUNG-MING y
BARDWELL, PHILLIP D.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 549 959 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra la proteína RGM A y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente solicitud describe anticuerpos monoclonales de unión a RGM A, y en particular versiones humanizadas, con injertos de CDR, de los mismos, que tienen la capacidad para unirse con RGM A y evitan la unión de proteínas RGM con el receptor de RGM A y otras proteínas de unión a RGM A, y de este modo neutralizan la función de RGM A. Estos anticuerpos pueden tener utilidad en el tratamiento de varios estados incluyendo pero sin limitación, esclerosis múltiple, traumatismo cerebral de mamíferos, lesión de la médula espinal, ictus, enfermedades neurodegenerativas y esquizofrenia.

15 **Información de antecedentes**

La regeneración axónica después de lesión o después de ataques inflamatorios o después de enfermedades neurodegenerativas dentro del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos es casi siempre imposible; el resultado depende del equilibrio entre la capacidad intrínseca de las fibras nerviosas en el SNC para volver a crecer, y los factores inhibidores dentro del SNC, localizados en el microambiente de la lesión o sitio dañado, que evitan activamente el recrecimiento, y por lo tanto la regeneración de los tramos de fibras lesionados.

Se ha establecido que la mielina del SNC, generada por oligodendrocitos, y la cicatriz de la lesión son las estructuras no permisivas más relevantes para el crecimiento axónico en la fase temprana de una lesión, provocando colapso del cono de crecimiento e inhibición del crecimiento de las neuritas *in vitro* así como *in vivo*, dando como resultado de este modo inhibición directa del recrecimiento axónico. Se han identificado proteínas RGM, factores inhibidores importantes en la mielina de SNC y tejido cicatricial (Monnier *et al.*, Nature 419: 392 - 395, 2002; Schwab *et al.*, Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a; Schwab *et al.* Eur. J. Neurosci. 21: 1569-76, 2005 b; Hata *et al.* J. Cell Biol. 173: 47-58, 2006; para revisiones véase: Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita *et al.* Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Las proteínas RGM están reguladas positivamente en sitios de daño o lesión en seres humanos que mueren de traumatismo cerebral o lesión isquémica, (Schwab *et al.*, Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a) y están reguladas positivamente en sitios de lesión en ratas con lesión de la médula espinal (Schwab *et al.* Eur. J. Neurosci. 21: 1569-76, 2005 b; Hata *et al.* J. Cell Biol. 173: 47-58, 2006 para una revisión véase: Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita *et al.* Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Además los primeros datos de uso de muestras clínicas de pacientes con esclerosis múltiple y personas sanas han sugerido que RGM A humana está regulada positivamente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen EM (datos no mostrados).

Para evaluar el potencial promotor de la regeneración de un anticuerpo policlonal específico de RGM A, los anticuerpos se administraron en un modelo de moderado a grave de lesión de la médula espinal, donde aproximadamente el 60% de la médula espinal en el nivel torácico 9/10 estaba seccionada. El examen histológico reveló que dicha lesión cortaba todas las fibras dorsales y laterales del tracto corticoespinal. El anticuerpo policlonal específico de RGM A proporcionado por vía local mediante una bomba durante dos semanas indujo regeneración a larga distancia de fibras nerviosas lesionadas (Hata *et al.*, J. Cell Biol. 173: 47-58, 2006).

Cientos de fibras nerviosas se extendieron más allá del sitio de lesión y las fibras más largas se regeneraron en más de 10 mm más allá de la lesión, mientras que no se descubrieron fibras regenerativas distantes a la lesión en animales tratados con anticuerpo de control. La recuperación funcional de las ratas tratadas con anti-RGM A se mejoró significativamente en comparación con las ratas con lesión de la médula espinal, tratadas con anticuerpo del control, demostrando de este modo que la RGM A es un inhibidor de neuroregeneración potente y una valiosa diana para estimular la recuperación en indicaciones caracterizadas por daño axónico o lesión de las fibras nerviosas (Hata *et al.*, J. Cell Biol. 173: 47-58, 2006; Kyoto *et al.* Brain Res. 1186: 74-86, 2007). Además, la neutralización de la proteína RGM A con un anticuerpo policlonal de bloqueo de función estimuló no solamente el recrecimiento de fibras nerviosas dañadas en las ratas con lesión de la médula espinal sino que potenció su formación de sinapsis permitiendo de este modo la reformación o restauración de circuitos neuronales dañados (Kyoto *et al.* Brain Res. 1186: 74-86, 2007).

La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes, dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de mamífero originando proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde RGM C desempeña un papel importante en el metabolismo del hierro. *In vitro*, RGM A inhibe la extensión de neuritas uniéndose con Neogenina, que se ha identificado como un receptor de RGM (Rajagopalan *et al.* Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La Neogenina se describió por primera vez como una proteína de unión a netrina (Keino-Masu *et al.* Cell, 87(2): 175-85, 1996). Este es un hallazgo importante porque se ha indicado que la unión de Netrina-1 con Neogenina o con su receptor estrechamente relacionado DCC (suprimido en cáncer colorrectal) estimula en lugar de inhibir el crecimiento de neuritas (Braisted *et al.* J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000). El bloqueo del RGM A libera por lo tanto la inhibición del crecimiento mediada por RGM permitiendo que la Neogenina se una con su ligando estimulante del crecimiento de

neuritas Netrina. Basándose en estas observaciones, puede suponerse que la neutralización de RGM A es superior a la neutralización de neogenina en modelos de lesión de la médula espinal humana. Además de la unión del RGM A con Neogenina y la inducción de la inhibición del crecimiento de neuritas, la unión de RGM A o B con las proteínas morfogénicas del hueso BMP-2 y BMP-4 podrían representar otro obstáculo para la neuroregeneración exitosa y la recuperación funcional (Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

Existe la necesidad en la técnica de anticuerpos mejorados capaces de unirse con RGM A, preferentemente un anticuerpo monoclonal que bloquea RGM A y evita la interacción entre RGM A y su receptor y/o proteínas de unión, es decir, Neogenina y BMP-2, BMP-4.

La presente solicitud proporciona (a) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizante contra RGM A, que inhibe selectivamente la unión del RGM A con su receptor Neogenina y con proteínas morfogénicas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y (b) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizante contra RGM A, que inhibe selectivamente la unión de RGM A con las proteínas morfogénicas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4). Se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención estimulen el recrecimiento de fibras nerviosas lesionadas o dañadas y la formación de sinapsis funcionales de fibras nerviosas en regeneración ya que uno de los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención parece transformar la naturaleza inhibidora de RGM A en una condición en la que las células neuronales prefieren migrar y crecer en un sustrato de RGM A, y no en un sustrato permisivo como Colágeno I. Además este anticuerpo es capaz de inducir regeneración a larga distancia en un modelo de rata *in vivo* de lesión del nervio óptico y también potencia la remielinización de fibras nerviosas lesionadas y en regeneración.

En consecuencia, se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención promuevan la regeneración neuronal y el recrecimiento de conexiones neuronales dañadas o rotas en el SNC humano lesionado e inflamado, por ejemplo, en esclerosis múltiple, después de lesión de la médula espinal, traumatismo cerebral, o en enfermedades neurodegenerativas tales como por ejemplo, Corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados que comprenden un dominio de unión a antígeno, donde dicho anticuerpo es capaz de unirse con un epítipo de una molécula de RGM, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos tres regiones determinantes de complementariedad y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos tres regiones determinantes de complementariedad, donde las regiones determinantes de complementariedad del dominio variable de cadena pesada tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58 y SEC ID N°: 59 y las regiones determinantes de complementariedad del dominio variable de cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 60, SEC ID N°: 61 y SEC ID N°: 62.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo que se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1×10^{-7} M o menos y una constancia de velocidad k_{off} de 1×10^{-2} s⁻¹ o menos, ambos determinados por resonancia de plasmón superficial.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que muestra las características cinéticas anteriores, que se une con RGM A humana y neutraliza la actividad inhibidora de la extensión de neuritas de RGM A humana como se determina en un ensayo *in vitro* convencional, por ejemplo el ensayo de extensión neuronal Ntera como se ejemplifica en el Ejemplo 3, posterior.

La invención también se refiere a un anticuerpo como se ha definido anteriormente, que tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

- unión a RGM A de rata,
- unión a RGM C humana, y
- unión a RGM C de rata

En particular, el anticuerpo como se describe en el presente documento modula la capacidad de RGM para unirse con al menos uno de sus receptores.

Dicho anticuerpo, en particular, se une con un dominio de unión a receptor del RGM A humano. Para RGM A se han identificado dominios de unión a receptor N y C terminal. Realizaciones particulares de los anticuerpos de la invención se unen con el dominio de unión al receptor N terminal de RGM A, como se ilustra por la inhibición de la unión entre un fragmento de hRGM A N terminal, como por ejemplo 47-168 y moléculas receptoras, como Neogenina y BMP-4. Dicho fragmento de hRGM A N terminal puede tener una longitud total de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 o de aproximadamente 30 a aproximadamente 122 restos de aminoácidos. Como un ejemplo no limitante puede mencionarse el Fragmento 0 (correspondiente a los restos N terminales 47-168) de hRGM A como se describe en este documento o cualquier fragmento de unión a receptor más corto.

En particular dicho anticuerpo modula, preferentemente inhibe, al menos una de las siguientes interacciones:

- 5 unión de RGM A humano con BMP-4 humano,
 unión de hRGM A con Neogenina humana,
 unión de hRGM C con Neogenina humana,
 unión de RGM A humana con BMP-2 humana.

10 De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo como se define en el presente documento es un anticuerpo humanizado.

El anticuerpo como se ha descrito anteriormente tiene un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse con un epítipo de una molécula de RGM y comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable que son el conjunto VH 5F9 y el conjunto VL 5F9.

15 El anticuerpo de acuerdo con la invención comprende además un marco conservado aceptor humano.

Dicho marco conservado aceptor humano puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

20 La proteína de unión de la invención puede comprender, en particular, al menos un conjunto de secuencias marco conservadas seleccionadas del grupo consiste en los conjuntos:

- 25 (1) conjunto VH3-48 (SEC ID N°: 15, 16 y 17)
 conjunto VH3-33 (SEC ID N°: 21, 22 y 23)
 conjunto VH3-23 (SEC ID N°: 24, 25 y 26)
 combinándose cada uno de dichos conjuntos con una secuencia marco conservada adicional, seleccionada de JH3 (SEC ID N°: 18),
 JH4 (SEC ID N°: 19),
 JH6 (SEC ID N°: 20);
 30 o
 (2) seleccionado del grupo que consiste en los conjuntos
 conjunto A18: (SEC ID N°: 27, 28 y 29)
 conjunto A17: (SEC ID N°: 31, 32 y 33)
 combinándose cada uno de dichos conjuntos con una secuencia marco conservada adicional, seleccionada de JK2 (SEC ID N°: 2).

40 De acuerdo con realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención comprende al menos un dominio variable de cadena pesada con injertos de CDR seleccionado de SEC ID N°: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43 y/o o al menos un dominio variable de cadena ligera con injertos de CDR seleccionado de SEC ID N°: 44, 45 y 46.

Más particularmente, el anticuerpo de la invención comprende una combinación de dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de:

- 45 SEC ID N°: 35 y 44; 36 y 44; 37 y 44; 38 y 44; 39 y 44; 40 y 44; 41 y 44; 42 y 44; 43 y 44;
 SEC ID N°: 35 y 45; 36 y 45; 37 y 45; 38 y 45; 39 y 45; 40 y 45; 41 y 45; 42 y 45; 43 y 45;
 SEC ID N°: 35 y 46; 36 y 46; 37 y 46; 38 y 46; 39 y 46; 40 y 46; 41 y 46; 42 y 46; 43 y 46.

50 En otra realización de la invención, dicho marco conservado aceptor humano del anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido de región marco conservada en un resto clave, seleccionándose dicho resto clave del grupo que consiste en:

- 55 un resto adyacente a una CDR;
 un resto de sitio de glucosilación;
 un resto poco habitual;
 un resto capaz de interactuar con un epítipo de RGM;
 un resto capaz de interactuar con una CDR;
 un resto canónico;
 un resto de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera;
 un resto dentro de una zona de Vernier;
 60 un resto N terminal con capacidad de formación de paraglutamato y
 un resto en una región que solapa entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un primer marco conservado de cadena pesada definido por Kabat.

65 En particular, dicho restos clave se seleccionan del grupo que consiste en (posición de secuencia de cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98
 (posición de secuencia de cadena ligera): 2, 4, 41, 51.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es o comprende un dominio variable humano consenso.

5 De acuerdo con otra realización del anticuerpo de la invención, dicho marco conservado aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos de región marco conservada, donde la secuencia de aminoácidos del marco conservado es de al menos 65%, como por ejemplo al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99%, idéntica a la secuencia de dicho marco conservado aceptor humano y comprende al menos 70 restos de aminoácidos, por ejemplo al menos 75, 80 u 85 restos, idénticos a dicho marco conservado aceptor humano.

10 De acuerdo con una en realización particular, el anticuerpo de la invención comprende al menos un dominio variable de marco conservado mutado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N°: 47, 48, 49, 50; (dominio VH) y/o
seleccionado del grupo que consiste en:
SEC ID N°: 51, 52, 53, y 54 (dominio VL)

15 En particular, dicho anticuerpo comprende dos dominios variables opcionalmente de marco conservado mutado, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de los grupos que consisten en:

20 SEC ID N°: 47 y 44; 47 y 45; 47 y 46; 47 y 51; 47 y 52; 47 y 53; 47 y 54;
SEC ID N°: 48 y 44; 48 y 45; 48 y 46; 48 y 51; 48 y 52; 48 y 53; 48 y 54;
SEC ID N°: 49 y 44; 49 y 45; 49 y 46; 49 y 51; 49 y 52; 49 y 53; 49 y 54;
SEC ID N°: 50 y 44; 50 y 45; 50 y 46; 50 y 51; 50 y 52; 50 y 53; 50 y 54.

25 Los anticuerpos de la invención como se describen en el presente documento son capaces de unirse con al menos una diana, seleccionada de moléculas de RGM.

30 En particular, son capaces de unirse con RGM A humana, y opcionalmente al menos una molécula de RGM adicional de origen humano o que se origina de monos cinomolgus, rata, pollo, rana y pez.

Por ejemplo, pueden unirse adicionalmente con RGM A de rata, RGM C humana y/o RGM C de rata.

35 En particular, el anticuerpo de la invención es capaz de modular, en particular, capaz de neutralizar o inhibir una función biológica de una diana, seleccionada de moléculas de RGM como se ha definido anteriormente.

En particular, el anticuerpo de la invención modula, en particular inhibe, la capacidad de RGM para unirse con al menos uno de sus receptores, como por ejemplo Neogenina y BMP, como BMP-2 y BMP-4.

40 Por ejemplo dicho anticuerpo modula, en particular reduce y preferentemente inhibe al menos una de las siguientes interacciones:

unión de RGM A humana con BMP-4 humana,

unión de hRGM A con Neogenina humana,

45 unión de hRGM C con Neogenina humana,

unión de RGM A humana con BMP-2 humana.

50 También están dentro del alcance de la invención anticuerpos con diferentes combinaciones de características funcionales, y en consecuencia que muestran diferentes perfiles funcionales, como se desvela en el presente documento. Se enumeran a continuación ejemplos no limitantes de dichos perfiles:

| Característica | Perfiles | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| Unión a RGM A humana | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Unión a RGM A de rata | + | - | + | - | + | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Unión a RGM C humana | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Unión a RGM C de rata | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inhibición de la unión de hRGM A con Neogenina humana | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inhibición de la unión de hRGM C con Neogenina humana | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inhibición de la unión de RGM A humana con BMP-2 humana | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inhibición de la unión de RGM A humana con BMP-4 humana | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Por ejemplo, el perfil 1 se consigue por el anticuerpo 5F9 como se proporciona por la presente invención y sus derivados descritos en el presente documento.

5 En particular, un anticuerpo de la invención es capaz de inhibir al menos una actividad biológica de RGM, en particular RGM A, donde dicha RGM A se selecciona de ser humano, monos, cinomolgus, rata, pollo, rana y pez.

De acuerdo con otra realización el anticuerpo de la invención tiene una o más de las siguientes características cinéticas:

- 10 (a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) para dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: al menos aproximadamente $10^2 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$, y al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial;
- 15 (b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente $10^2 s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^3 s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^4 s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^5 s^{-1}$; y como máximo aproximadamente $10^6 s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial; o
- 20 (c) una constante de disociación (K_D) para dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente $10^{-7} M$; como máximo aproximadamente $10^{-8} M$; como máximo aproximadamente $10^{-9} M$; como máximo aproximadamente $10^{-10} M$; como máximo aproximadamente $10^{-11} M$; como máximo aproximadamente $10^{-12} M$; y como máximo $10^{-13} M$.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona una construcción de anticuerpo que comprende un anticuerpo descrito anteriormente, comprendiendo además dicha construcción de anticuerpo un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina.

30 Dicha construcción de anticuerpo de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injertos de CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv con enlaces disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un único dominio, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, una inmunoglobulina de dominio variable doble, y un anticuerpo biespecífico.

35 En una construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención dicho anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en:

- un dominio constante IgM humano,
 un dominio constante IgG1 humano
 un dominio constante IgG2 humano
 un dominio constante IgG3 humano
 40 un dominio constante IgG4 humano
 un dominio constante IgE humano
 un dominio constante IgD humano
 un dominio constante IgA1 humano
 un dominio constante IgA2 humano
 45 un dominio constante IgY humano y
 dominios constantes mutados correspondientes

50 En particular, una construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 11, 12, 13 y 14.

55 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo que comprende una construcción de anticuerpo descrita en el presente documento, comprendiendo además dicho conjugado de anticuerpo un agente seleccionado del grupo que consiste en: una molécula de inmunoadhesión, un agente de captura de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico, conjugándose cada uno de dichos agentes, por ejemplo uniéndose covalentemente con dicha proteína de unión.

60 Por ejemplo, dicho agente es un agente de captura de imágenes seleccionado del grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético, y biotina. En particular, dicho agente de captura de imágenes es un radiomarcador seleccionado el grupo que consiste en: ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho y ¹⁵³Sm.

65 Por ejemplo, dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina y un agente apoptótico.

De acuerdo con otra realización, dicho anticuerpo de la invención como se describe en el presente documento posee un patrón de glucosilación humano.

5 Además, los anticuerpos, las construcciones de anticuerpo y los conjugados de anticuerpo de acuerdo con la invención pueden existir como un cristal (en forma cristalina), preferentemente que conserva actividad biológica.

10 En particular, dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico sin vehículo. A la vista de dicho cristalino del anticuerpo, la construcción de anticuerpo o el conjugado de anticuerpo pueden tener una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble correspondiente.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de anticuerpo, secuencia de aminoácidos de construcción de anticuerpo y secuencia de aminoácidos de conjugado de anticuerpo como se describe en el presente documento.

15 La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico aislado como se describe en el presente documento. En particular, el vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

20 La invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende dicho vector. En particular, dicha célula hospedadora es una célula procariota, como por ejemplo *E. coli*; o es una célula eucariota, y puede seleccionarse del grupo que consiste en célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica. En particular, dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en: una célula de mamífero, una célula aviar y una célula de insecto. Preferentemente dicha célula hospedadora se selecciona de células HEK, células CHO, células COS y células de levadura. La célula de levadura puede ser de *Saccharomyces cerevisiae* y dicha célula de insecto puede ser una célula Sf9.

30 La invención también proporciona un método para producir una proteína capaz de unirse con RGM, que comprende cultivar una célula hospedadora como se define en el presente documento en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse con RGM.

La invención también se refiere a una proteína producida de acuerdo con dicho método.

35 La invención también proporciona una composición para la liberación de un anticuerpo, comprendiendo dicha composición

- (a) una formulación, donde dicha formulación comprende una proteína de producto cristalizado como se define en el presente documento, y un ingrediente; y
- (b) al menos un vehículo polimérico.

40 Dicho vehículo polimérico puede ser un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste en: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxitirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil)metacrilamida), poli [(órgano) fosfaceno], poli (ortoésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alkil éter, polioles de pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucosaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

50 Dicho ingrediente puede seleccionarse del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención proporciona una composición como se define en el presente documento para su uso en un método para tratar a un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición como se define en el presente documento.

55 De acuerdo con otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el producto (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Dicho vehículo farmacéuticamente aceptable puede actuar como un adyuvante útil para aumentar la absorción o dispersión de dicho anticuerpo.

Por ejemplo dicho adyuvante es hialuronidasa.

65 De acuerdo con otra realización dicha composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de RGM es perjudicial. Por ejemplo dicho agente se selecciona del grupo que consiste en: agente terapéutico, agente de captura de imágenes, agente citotóxico,

inhibidores de angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueadores de moléculas de co-estimulación, bloqueadores de moléculas de adhesión; anticuerpo anti-citocinas o fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcador o indicador detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico; un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un producto radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación de asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citocina y un antagonista de citocinas.

La presente invención también se refiere a un método para reducir la actividad de RGM A humana que comprende poner en contacto RGM A humana con al menos un producto (en particular, una proteína de unión, construcción o conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento), de modo que se reduzca al menos una actividad de RGM A humana.

La presente invención también se refiere a un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para su uso en un método para reducir la unión de hRGM A con el receptor de Neogenina en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al sujeto un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento).

La presente invención también se refiere a un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para su uso en un método para reducir la unión de hRGM A con la proteína morfogenética del hueso 2 y/o proteína morfogenética del hueso 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al sujeto un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento).

La presente invención también se refiere a un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para su uso en un método para tratar a un sujeto de un trastorno asociado con la actividad de RGM A que comprende la etapa de administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento).

La presente invención también se refiere a un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para su uso en un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un producto de la invención (en particular, un anticuerpo, una construcción o un conjugado como se ha descrito anteriormente en el presente documento), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Dicho trastorno comprende preferentemente enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, incluyendo lesión cerebral traumática, Parálisis Cerebral, Guillain Barre, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Postpolio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Espinales, Ictus, Mielitis Transversa; demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hiperkinesias, manías, Enfermedad de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma y enfermedad de Alzheimer.

Se describen a continuación aspectos particulares adicionales de la invención:

Un anticuerpo monoclonal aislado de la invención que interacciona específicamente con al menos un epítipo de una proteína hGRM A;

dicho anticuerpo que es un anticuerpo neutralizante monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo;

dicho fragmento de unión a antígeno que comprende un dominio VH y uno VL;

dicho anticuerpo neutralizante que reduce la capacidad de hRGMA A para unirse con su receptor;

dicho anticuerpo neutralizante que es capaz de inhibir la actividad biológica de hRGM A;

dicho anticuerpo que reconoce un receptor de RGM A seleccionado de ser humano, monos, cerdos, ratón, pollo, rana y pez;

dicho anticuerpo que reconoce una proteína RGM A que comparte el 90% de homología con la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2;

dicho anticuerpo donde la proteína RGM A está codificada por un ácido nucleico que comparte el 90% de homología con la secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 1;

dicho anticuerpo que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEC ID N°: 9 o

- 34 o una versión humanizada, opcionalmente mutada adicionalmente, de dicha región VH;
dicho anticuerpo que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEC ID N°: 10 o una versión humanizada, opcionalmente mutada adicionalmente de dicha región VL;
- 5 dicho anticuerpo que se une con hRGM A donde el anticuerpo está glucosilado;
dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, uno quimérico, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico;
- 10 dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv;
dicho anticuerpo monoclonal que se une específicamente con al menos un epítipo de hRGM A, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma como se describe en el presente documento;
- 15 dicho anticuerpo monoclonal, donde la unión da como resultado la inactivación de la interacción de hRGM A con su receptor;
dicha línea celular de hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal;
dicha línea celular de hibridoma, donde el hibridoma se selecciona del grupo que consiste en hibridoma humano, de ratón, de rata, de oveja, de cerdo, de vaca, de cabra y de caballo;
- 20 dicho anticuerpo monoclonal, donde la unión da como resultado inactivación de hRGM A;
dicha línea celular de hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal;
dicha línea celular de hibridoma, donde el hibridoma se selecciona del grupo que consiste en hibridoma humano, de ratón, de rata, de oveja, de cerdo, de vaca, de cabra y de caballo;
- 25 dicho anticuerpo neutralizante monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en:
- a) unión con RGM A de mamífero con afinidad en el intervalo nM o menor;
 - b) antagonismo funcional *in vitro* de la actividad de RGM A en el ensayo de extensión de neuritas con eficacia μM, nM o menor;
 - c) inducción *in vivo* de brote en el modelo de contusión del nervio óptico;
 - d) inducción *in vivo* de brote en el modelo de lesión de la médula espinal;
 - e) alivio de lesión de la médula espinal experimental *in vivo* potenciando el crecimiento regenerativo de fibras nerviosas lesionadas; o
 - f) alivio de lesión de la médula espinal experimental *in vivo* promoviendo la formación de sinapsis;
- 30 un ácido nucleico aislado que codifica dicho anticuerpo neutralizante monoclonal o fragmento de unión a antígeno;
un vector que comprende dicho ácido nucleico aislado;
- 40 dicho vector seleccionado del grupo que consiste en pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; pHybE y pBJ;
una célula hospedadora transformada con dicho vector en consecuencia donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica;
dicha célula hospedadora, donde la célula animal es una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende HEK293, CHO y COS;
- 45 una célula hospedadora transformada con dicho vector, donde la célula hospedadora es una célula eucariota;
un método para reducir dicho anticuerpo que comprende cultivar dicha célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir el anticuerpo;
una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 50 dicho anticuerpo para uso en un método para reducir la unión de hRGM A con el receptor de Neogenina en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al sujeto dicho anticuerpo;
dicho anticuerpo para uso en un método para reducir la unión de hRGM A con la proteína morfogenética del hueso 2 y proteína morfogenética del hueso 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al sujeto dicho anticuerpo,
- 55 dicho anticuerpo para uso en un método para tratar en un sujeto un trastorno asociado con la actividad de RGM A que comprende la etapa de administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos dicho anticuerpo;
dicho anticuerpo para uso en un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrar al sujeto dicho anticuerpo solo o en combinación con otros agentes terapéuticos;
- 60 dicho anticuerpo, que comprende al menos una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43;
dicho anticuerpo, que comprende al menos una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 44, 45 y 46;
- 65 dicho anticuerpo, modificado adicionalmente por de 1 a 5 mutaciones en una secuencia VH o VL; y
dicho anticuerpo, donde las mutaciones se seleccionan de retromutaciones de marco conservado y mutaciones

restos de Vernier y de interfaz VH/VL.

Cualquier enseñanza o referencia a SEC ID N°: 34 como se desvela en el presente documento en analogía se aplica a SEC ID N°: 9.

5

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1A muestra los anticuerpos monoclonales que se unen con hRGM A en un ensayo de ELISA.

10

La Figura 1B representa los anticuerpos monoclonales que se unen con hRGM A expresada en células HEK 293.

La Figura 1C representa los anticuerpos monoclonales que se unen con hRGM A de rata expresada en células HEK 293.

La Figura 2 muestra la unión de RGM A de longitud completa con Neogenina. El MAB 5F9 inhibe la unión de hRGM A de longitud completa, acoplada a fc con Neogenina.

15

La Figura 3 representa la unión de RGM A de longitud completa con BMP-4. El MAB 5F9 inhibe la unión de un fragmento de hRGM A de longitud completa acoplado a fc (47 – 422) con BMP-4.

La Figura 4 representa el fragmento 0 de RGM A que se une con BMP-4. El MAB 5F9 inhibe la unión del fragmento 0 de hRGM A acoplado a fc (47 – 168) con BMP-4.

20

La Figura 5 muestra la unión de RGM A de longitud completa con BMP-2. El MAB 5F9 inhibe la unión de un fragmento de hRGM A de longitud completa acoplado a fc (47 – 422) con BMP-2.

La Figura 6 es una combinación de microfotografías que muestran la neutralización por mAb 5F9 del fragmento de RGM A en ensayo de extensión de neuritas de células Ntera. El MAB 5F9 neutraliza la actividad inhibitoria de la extensión de un fragmento inhibitor de hRGM A potente conjugado con fc, en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de Ntera humanos. A. Cultivo de control, crecimiento de neuronas Ntera en laminina, B. en un sustrato de fragmento de hRGM A-laminina (47 – 168), C. – E. en un sustrato de fragmento de hRGM A-laminina (47 – 168) en presencia de MAB 5F9 0,1 µg/ml (C.), MAB 5F9 1 µg/ml (D.), MAB 5F9 10 µg/ml (E.).

25

La Figura 7 muestra el análisis cuantitativo de los resultados de 2 ensayos de Ntera. El MAB 5F9 neutraliza de forma dependiente de dosis la actividad inhibitoria de la extensión de un fragmento inhibitor de hRGM A potente, conjugado con fc (fragmento 0, 47 – 168) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de Ntera humanos.

30

La Figura 8 muestra el análisis cuantitativo del ensayo de tiras de SH-SY5Y. El MAB 5F9 neutraliza la repulsión, inducida por tiras que consisten en RGM A humana de longitud completa de células neuronales SH-SY5Y humanas en alfombras de membrana en tiras. En ausencia de MAB 5F9 (A) o en presencia de bajas concentraciones de MAB las neuronas SH-SY5Y prefieren evitar las tiras de RGM A. Este comportamiento se invierte por concentraciones crecientes del MAB 5F9. (B a D) A la mayor concentración de MAB (10 µg/ml) (E), las neuronas SH-SY5Y muestran una fuerte preferencia por las tiras de RGM A en comparación con las tiras de Colágeno I.

35

La Figura 9 resume el análisis cuantitativo de las características de unión de los mAB 5F9 y 8D1. Los mAB 5F9 y 8D1 se evalúan en ensayos de unión de hRGM A – neogenina, hRGM A - BMP-2 y hRGM A - BMP-4 a diferentes concentraciones.

40

La Figura 10 muestra la actividad neutralizante para la actividad quimiorrepulsiva de hRGM A de anticuerpos 5F9 humanizados (h5F9.21, h5F9.23, h5F9.25) en un ensayo de quimiotaxis de SH-SY5Y.

La Figura 11 muestra la actividad neuroregenerativa *in vivo* de la aplicación de 5F9 local en un modelo animal de lesión del nervio óptico. La aplicación local de MAB 5F9 neutraliza RGM A y estimula el crecimiento regenerativo de axones del nervio óptico dañado en un modelo animal de rata de contusión del nervio óptico. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras GAP-43 positivas se extienden más allá del sitio de contusión a diferencia del MAB de control 8D1 (B), que no se une con RGM A de rata.

45

Las Figuras 12 A y Figuras 12 B muestran el análisis cuantitativo de aplicación de 5F9 local en un modelo animal de lesión del nervio óptico. (A) 5F9 pero no el MAB de control 8D1 aumentó significativamente el número de fibras GAP-43 positivas regenerativas. Se observaron significativamente más fibras ($p < 0,05$) en animales tratados con 5F9 a distancias de 200 µm, 400 µm y 600 µm y a 1200 µm solamente se encontraron fibras en animales tratados con 5F9 pero no en animales de control (B) 5F9 aumentó significativamente el área GAP-43 positiva en el sitio de lesión de nervio óptico en comparación con el anticuerpo de control 8D1 y el control de vehículo PBS. El área de crecimiento regenerativo (área GAP-43 positiva) se midió usando el software Axiovision (Zeiss).

50

La Figura 13 muestra la actividad neuroregenerativa *in vivo* de la aplicación de 5F9 sistémico en un modelo animal de lesión de nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o vehículo se proporcionó por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras GAP-43 positivas se extendían más allá del sitio de contusión a diferencia de los animales de control tratados con PBS (B). El sitio de contusión se localiza en el margen izquierdo y las fibras regenerativas se tiñen con un anticuerpo para GAP-43. Se observan muchas fibras en el borde superior e inferior del nervio óptico en animales tratados con 5F9 pero no en animales con PBS.

60

La Figura 14 A y Figura 14 B muestra el análisis cuantitativo de la aplicación de 5F9 sistémico en un modelo animal de lesión del nervio óptico.

65

La **Figura 15** muestra la actividad remielinizante *in vivo* de la aplicación de 5F9 sistémico en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o vehículo se proporcionó por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata. La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina proteína básica de mielina MBP. Se localizan sitios de contusión en el medio de los nervios compuestos y el área está libre en animales de control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en el área media (centro de contusión) de los nervios ópticos.

La **Figura 16** muestra el efecto cuantitativo en la remielinización de la de aplicación de 5F9 sistémico en un modelo animal de lesión del nervio óptico.

Descripción detallada

La presente invención describe anticuerpos de RGM A monoclonales, especialmente anticuerpos de RGM A monoclonales, humanizados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen con RGM A. Diversos aspectos de la presente solicitud se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células hospedadoras para preparar dichos anticuerpos y fragmentos. La invención también abarca métodos para usar los anticuerpos de la presente solicitud para detectar RGM A humana; para neutralizar la actividad de RGM humana y/o RGM A humana, bien *in vivo* o bien *in vitro* y para regular la expresión génica.

1. Definiciones generales

A no ser que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden habitualmente por los expertos habituales en la materia. El significado y alcance de los términos resultarán evidentes, sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tendrán preferencia sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a no ser que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique de otro modo. Además, el uso del término "incluyendo" así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a no ser que se indique específicamente de otro modo.

En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácido nucleico e hibridación descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan habitualmente en este campo. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en este campo y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a no ser que se indique de otro modo. Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realizan habitualmente en este campo o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son los que se conocen bien y se usan habitualmente en este campo. Se usan técnicas convencionales para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

Se definen a continuación términos seleccionados para que la presente invención se pueda entender más fácilmente.

El término "polipéptido" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan indistintamente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o un polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente sin otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de forma natural estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede hacerse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en este campo.

El término "recuperar" como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de hacer a una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, por

ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en este campo.

La expresión "RGM A humana" (abreviada en el presente documento como hRGM A) como se usa en el presente documento se refiere a una glucoproteína anclada en glucosilfosfatidilinositol (gpi) con 450 aminoácidos, se describió en primer lugar como un repelente de crecimiento de neuritas o inhibidores de crecimiento de neuritas durante el desarrollo de proyecciones topográficas (Stahl *et al.* Neuron 5: 735-43, 1990; Mueller, en Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, Editado por H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215 - 229, 1997). La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes, dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de mamíferos, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde desempeña un papel importante en el metabolismo del hierro. Las proteínas RGM humanas tienen una identidad de secuencia del 43%-50%; la homología de aminoácidos de RGM A humana y de rata es del 89%. Las proteínas RGM humanas no comparten ninguna homología de secuencia significativa con ninguna otra proteína conocida. Son proteínas ricas en prolina que contienen una región RGD y tienen homología estructural con el dominio de Factor de Von-Willebrand y se escinden en el aminoácido N terminal 168 por una proteasa desconocida para producir la proteína funcionalmente activa (Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

In vitro, RGM A inhibe la extensión de neuritas a concentraciones picomolares uniéndose con Neogenina, que se ha identificado como un receptor de RGM (Rajagopalan *et al.* Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La Neogenina se describió por primera vez como una proteína de unión a netrina (Keino-Masu *et al.* Cell, 87(2):175-85, 1996), pero su afinidad por Netrina (K_d 2 nM) es una orden de magnitud menor que la de por RGM (K_d 0,2 nM) (Rajagopalan *et al.* Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). Esto es un hallazgo importante porque se ha indicado que la unión de Netrina-1 con Neogenina o con su receptor estrechamente relacionado DCC (suprimido en cáncer colorrectal) estimula en lugar de inhibir el crecimiento de neuritas (Braisted *et al.* J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000).

Además de la unión del RGM A con Neogenina y la inducción de la inhibición del crecimiento de neuritas, la unión de RGM A o B con las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-4 podrían representar otro obstáculo para la neurorregeneración exitosa y la recuperación funcional (Mueller *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006). Se ha indicado que ambas clases de proteínas (Neogenina y las BMP) transducen la señal inhibidora de crecimiento de neuritas del RGM A mediante dos rutas de transducción de señal completamente diferentes e independientes. Habitualmente, la expresión de estas proteínas BMP es relativamente baja en la mayoría de las regiones del SNC adulto, pero se han indicado rápidos aumentos en la expresión y acumulación de algunas BMP (por ejemplo, BMP-2, BMP-6, BMP-7) en respuesta a lesión y daño (Lai *et al.*, Neuroreport 8: 2691 - 94, 1997; Martínez *et al.* Brain Res. 894: 1 - 11, 2001; Hall y Miller, J. Neurosci. Res. 76: 1-8, 2004; Setoguchi *et al.*, Exp. Neurol. 189: 33-44, 2004). Además, en un modelo de esclerosis múltiple, el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), BMP-4, BMP-6 y BMP-7 estaban reguladas positivamente en la médula espinal de ratón (Ara *et al.*, J. Neurosci. Res. 86: 125-35, 2008). Se ha indicado que BMP-2 inhibe el crecimiento de neuritas uniéndose con RGM A de superficie celular, receptores de BMP-I y II y activando directamente la LIM-quinasa (Matsuura *et al.* Biochem Biophys Res Common., 360: 868-73, 2007) y se espera por lo tanto que el bloqueo de la interacción de RGM A-BMP-2 aumente adicionalmente la recuperación funcional después de lesión del SNC.

Como se ha mencionado anteriormente, las ratas con lesiones espinales y seres humanos con lesión cerebral, muestran acumulaciones masivas de RGM celular en el sitio de la lesión y el patrón de tinción de RGM A en ratas en el sitio de lesión espinal es muy similar a la tinción de anticuerpo pan RGM en seres humanos, lo que sugiere que la mayor parte de tinción pan RGM en seres humanos se relaciona con la localización de RGM A pero no la localización de RGM B (Schwab *et al.*, Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a; Schwab *et al.* Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata *et al.* J. Cell Biol. 173:47-58, 2006). En el cerebro humano sano, la tinción pan RGM (inmunorreactividad RGM A y B) se detectó en fibras de materia blanca, oligodendrocitos, pericarion de algunas neuronas, algo de músculo liso vascular y algunas células endoteliales. No se observó tinción de astrocitos. El patrón de tinción de RGM en cerebro humano adulto sano es muy similar al patrón de tinción observado en médulas espinales de rata adulta (Schwab *et al.* Eur. J. Neurosci. 21: 1569-76, 2005 b; Hata *et al.* J. Cell Biol. 173: 47-58, 2006).

Basándose en la acumulación de RGM A en sitios de lesión en daño cerebral y de la médula espinal y debido a su actividad inhibidora de crecimiento de neuritas celulares, se espera que la proteína ejerza actividad inhibidora del crecimiento de neuritas y su neutralización por anticuerpos, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, que se unen con al menos un epítipo de la RGM A humana podría dar como resultado recrecimiento mejorado de fibras nerviosas lesionadas y una potenciación de la recuperación funcional en indicaciones caracterizadas por lesión de fibras nerviosas y acumulación de RGM.

A no ser que se indique de otro modo la expresión "RGM A" también abarca moléculas de RGM A aisladas u obtenidas de otras especies, como por ejemplo, roedores, como ratones o ratas; específicamente, la molécula derivada de rata se designa en el presente documento "RGMA A de rata"

TABLA 1: LISTA DE SECUENCIAS DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON RGM A

| Proteína | Identificador de secuencia | Descripción |
|---------------|----------------------------|--|
| hRGM A | SEC ID Nº 2 | Secuencia proteica de RGM A humana |
| | SEC ID Nº 1 | Secuencia de nucleótidos de RGM A humana |
| hRGM A | SEC ID Nº 4 | Secuencia proteica de RGM A-fc humana |
| | SEC ID Nº 3 | Secuencia de nucleótidos de RGM A-fc humana |
| hRGM A | SEC ID Nº 6 | Secuencia proteica de cadena ligera de RGM A – fc humana |
| | SEC ID Nº 5 | Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de RGM A – fc humana |
| RGM A de rata | SEC ID Nº 8 | Secuencia proteica de RGM A de rata |
| | SEC ID Nº 7 | Secuencia de nucleótidos de RGM A de rata |

“Actividad biológica” como se usa en el presente documento, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de RGM A como se define en el presente documento.

5 Las expresiones “unión específica” o “que se une específicamente”, como se usan en el presente documento, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un “determinante antigénico” o “epítipo” como se define posteriormente) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une con
10 una estructura proteica específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A no marcado, libre), en una reacción que contiene “A” marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido con el anticuerpo.

15 El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de la misma, que conserva las características de unión a epítipo esenciales de una molécula Ig. Dichos formatos del anticuerpo mutantes, variantes o derivados se conocen en la técnica. Se analizan posteriormente realizaciones no limitantes de los
20 mismos. Se dice que un anticuerpo tiene “capacidad de unión” con una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir de este modo la molécula con el anticuerpo.

Se entiende que un “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que comparten una secuencia de aminoácidos de cadena pesada común y cadena ligera común, a diferencia de preparaciones de anticuerpos “policlonales” que contienen una mezcla de diferentes
25 anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos monoclonales por varias tecnologías nuevas como presentación en fagos, en bacterias, en levadura o ribosómica, así como métodos clásicos ejemplificados por los anticuerpos derivados de hibridoma (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado por tecnología de hibridomas, tal como la metodología de hibridoma de Kohler y Milstein convencional ((1975) Nature 256: 495-497).

30 En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La acción constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una
35 región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo,
40 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

La expresión “parte de unión a antígeno” o “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo”), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más
45 fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente con un antígeno (por ejemplo, hRGM A). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, específicos dobles o multi-específicos; uniéndose específicamente con dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un
50 fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546, Winter *et al.*, publicación de PCT WO 90/05144 A1 incorporada en el presente documento por referencia), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.
55 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que se compongan como una única

cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan 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). También se entiende que dichos anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos también están abarcadas. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en los que se expresan dominios VH y VL en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a 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). Dichas partes de unión a anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

La expresión “construcción de anticuerpo” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una o más de las partes de unión a antígeno de la invención unidas con un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se usan para unir una o más partes de unión a antígeno. Dichos polipéptidos enlazadores se conocen bien en la técnica (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). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Se conocen en la técnica secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humana y se representan en la Tabla 2.

TABLA 2: SECUENCIA DE DOMINIO CONSTANTE DE CADENA PESADA Y DOMINIO CONSTANTE DE CADENA LIGERA DE IgG HUMANA

| Proteína | Identificador de Secuencia | Secuencia |
|--|----------------------------|--|
| | | 123456789012345678901234567890 |
| Región constante Ig gamma-1 | SEC ID N°: 11 | ASTKGPVSFVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPTEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QOQNVFSCSVMHREALNHYTEOKSLSLSPGK |
| Mutante de región constante Ig gamma-1 | SEC ID N°: 12 | ASTKGPVSFVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPTEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QOQNVFSCSVMHREALNHYTEOKSLSLSPGK |
| Región constante Ig Kappa | SEC ID N°: 13 | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC |
| Región constante Ig Lambda | SEC ID N°: 14 | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS |

Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para realizar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C terminal para realizar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). A partir de anticuerpos completos pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o con pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, como se describe en el presente documento, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión, usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

Se entiende que un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente con hRGM A que está sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente con antígenos distintos de hRGM A). Un anticuerpo aislado que se une específicamente con hRGM A puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de RGM A de otra especie. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Se entiende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en la CDR y en particular CDR3. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de marco conservado humano.

Se entiende que la expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedadora (descrita adicionalmente posteriormente), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humana recombinante, combinatoria (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann SA., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. *et al* (2000) Immunology Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas con regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico puede producirse mediante técnicas de biología molecular recombinante, o pueden conjugarse físicamente entre sí.

La expresión "anticuerpo con injertos de CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en las que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan con secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murina en las que una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) se han reemplazado con secuencias de CDR humanas.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estas expresiones, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (es decir hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH nº

91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones “aceptor” y “anticuerpo aceptor” se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco conservadas. En algunas realizaciones, el término “aceptor” se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica la región o las regiones constantes. En otra realización más, el término “aceptor” se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco conservadas y la región o las regiones constantes. En una realización específica, el término “aceptor” se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 80%, preferentemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco conservadas. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 restos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco conservada aceptora y/o región o regiones constantes aceptoras pueden, por ejemplo, derivar u obtenerse de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo o anticuerpos disponibles en el mercado).

Como se usa en el presente documento, el término “CDR” se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Hay al menos tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión “conjunto de CDR” como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una única región variable capaces de unirse con el antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de forma diferente según sistemas diferentes. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)), no solo proporciona un sistema de numeración de restos inequívoco, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de restos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) y Chothia *et al.*, Nature 342: 877-883 (1989)) descubrieron que ciertas subpartes dentro de las CDR de Kabat adoptaban conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad al nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subpartes se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la “L” y la “H” designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que solapan con CDR de Kabat. Otros límites que definen CDR que solapan con las CDR de Kabat se han descrito en Padian (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5): 732-45 (1996)). Otras definiciones de límites de CDR más pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero solaparán no obstante con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de la predicción o hallazgos experimentales de que restos particulares o grupos de restos o incluso CDR completas no influyen significativamente en la unión a antígeno. Los métodos usados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas usan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa en el presente documento, el término resto “canónico” se refiere a un resto en una CDR o marco conservado que define una estructura de CDR canónica particular como se define en Chothia *et al.* (J. Mol. Biol. 196: 901-907 (1987); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 799 (1992), ambas se incorporan en el presente documento por referencia). De acuerdo con Chothia *et al.*, partes críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencias de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de cadena principal peptídica para un segmento contiguo de restos de aminoácidos que forman un bucle.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “donante” y “anticuerpo donante” se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones marco conservadas. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión “anticuerpo donante” se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Como se usa en el presente documento, la expresión “marco conservado” o “secuencia de marco conservado” se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse por sistemas diferentes, el significado de una secuencia marco conservada está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, -L2 y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones marco conservadas en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se sitúa entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco conservada, como se denomina por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Como se usa en el presente

documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco conservada.

5 Se conocen en la técnica secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas. En una realización de la invención las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humana se seleccionan de las secuencias descritas en la Tabla 3 y en la Tabla 4. Se indican en dichas tablas diferentes combinaciones para secuencias marco conservadas humanas FR1 a FR4.

TABLA 3: SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA PESADA HUMANA

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|------------------|----------------------------------|
| | | 12345678901234567890123456789012 |
| 15 | VH3 - 48/JH3 FR1 | EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 16 | VH3 - 48/JH3 FR2 | WVROAPGKGLEWVS |
| 17 | VH3 - 48/JH3 FR3 | RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR |
| 18 | VH3 - 48/JH3 FR4 | WGQGTMTVSS |
| 15 | VH3 - 48/JH4 FR1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 16 | VH3 - 48/JH4 FR2 | WVRQAPGKGLEWVS |
| 17 | VH3 - 48/JH4 FR3 | RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR |
| 19 | VH3 - 48/JH4 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 15 | VH3 - 48/JH6 FR1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 16 | VH3 - 48/JH6 FR2 | WVRQAPGKGLEWVS |
| 17 | VH3 - 48/JH6 FR3 | RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR |
| 20 | VH3 - 48/JH6 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 21 | VH3 - 33/JH3 FR1 | QVQLVFSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| 22 | VH3 - 33/JH3 FR2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| 23 | VH3 - 33/JH3 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| 18 | VH3 - 33/JH3 FR4 | WGQGTMTVSS |
| 21 | VH3 - 33/JH4 FR1 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| 22 | VH3 - 33/JH4 FR2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| 23 | VH3 - 33/JH4 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| 19 | VH3 - 33/JH4 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 21 | VH3 - 33/JH6 FR1 | QVQLVFSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| 22 | VH3 - 33/JH6 FR2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| 23 | VH3 - 33/JH6 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| 20 | VH3 - 33/JH6 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 24 | VH3 - 23/JH3 FR1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 25 | VH3 - 23/JH3 FR2 | WVRQAPSKGLEWVS |
| 26 | VH3 - 23/JH3 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK |
| 18 | VH3 - 23/JH3 FR4 | WGQGTMTVSS |
| 24 | VH3 - 23/JH4 FR1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 25 | VH3 - 23/JH4 FR2 | WVRQAPGKGLEWVS |
| 26 | VH3 - 23/JH4 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK |
| 19 | VH3 - 23/JH4 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 24 | VH3 - 23/JH6 FR1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 25 | VH3 - 23/JH6 FR2 | WVRQAPGKGLEWVS |
| 26 | VH3 - 23/JH6 FR3 | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK |
| 20 | VH3 - 23/JH6 FR4 | WGQGTTLTVSS |

10

TABLA 4: SECUENCIAS ACEPTORAS DE CADENA LIGERA HUMANA

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|----------------------------------|
| | | 12345678901234567890123456789012 |
| 27 | A18/JK2 FR1 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC |
| 28 | A18/JK2 FR2 | WYLQKPGQSPQLLIY |
| 29 | A18/JK2 FR3 | GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC |
| 30 | A18/JK2 FR4 | FGQGTKLEIKR |
| 31 | A17/JK2 FR1 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC |
| 32 | A17/JK2 FR2 | WFQQRPGQSPRRLIY |
| 33 | A17/JK2 FR3 | GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC |
| 30 | A17/JK2 FR4 | FGQGTKLEIKR |

15

Como se usa en el presente documento, la expresión “gen de anticuerpo de línea germinal” o “fragmento génico” se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a reordenación genética y mutación para la expresión de una inmunoglobulina

particular (véase, por ejemplo Shapiro *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención surge del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de línea germinal tienen más probabilidad que los genes de anticuerpos maduros de conservar estructuras de secuencia de aminoácidos esenciales características de individuos en las especies, y por lo tanto es menos probable que se reconozcan como de una fuente ajena cuando se usan de forma terapéutica en esa especie.

Como se usa en el presente documento, el término restos “clave” se refiere a ciertos restos dentro de la región variable que tienen más influencia en la especificidad y/o afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un resto clave incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un resto que es adyacente a una CDR, un sitio de glucosilación potencial (puede ser un sitio de glucosilación N u O), un resto poco habitual, un resto capaz de interactuar con el antígeno, un resto capaz de interactuar con una CDR, un resto canónico, un resto de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable cadena ligera, un resto dentro de la zona de Vernier, y un resto en la región que solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer marco conservado de cadena pesada.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere en general a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, como un ratón) pero en los que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para ser más de “tipo humano”; es decir, más similar a secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con injertos de CDR, en el que se introducen secuencias de CDR humanas en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes.

En particular, la expresión “anticuerpo humanizado” como se usa en el presente documento, es un anticuerpo o una variante, un derivado, un análogo, o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente con un antígeno de interés y que comprende una región marco conservada (FR) que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente” en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, preferentemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y puede seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en este campo.

No es necesario que las regiones marco conservadas y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR de anticuerpo donante o el marco conservado consenso pueden mutarse por sustitución, inserción y/o deleción de al menos un resto de aminoácido de modo que el resto de CDR o marco conservado en ese sitio no corresponda al anticuerpo donante o al marco conservado consenso. En una realización preferida, dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Habitualmente, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90% y más preferentemente al menos 95% de los restos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de FR y CDR parentales. Como se usan en el presente documento, la expresión “marco conservado consenso” se refiere a la región marco conservada en la secuencia de inmunoglobulina consenso. Como se usa en el presente documento, la expresión “secuencia de inmunoglobulina consenso” se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) de aparición más frecuente en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen de forma igualmente frecuente, puede incluirse cualquiera de ellos en la secuencia consenso.

Como se usa en el presente documento, una zona de “Vernier” se refiere a un subconjunto de restos de marco conservado que pueden ajustar la estructura de CDR y perfeccionar el ajuste al antígeno como se describe en Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499, que se incorpora en el presente documento por referencia). Los restos de la zona de Vernier forman una capa que subyace a las CDR y puede influir en la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

La expresión “inhibición de la unión” de RGM con uno de sus receptores como se usa en el presente documento abarca una reducción parcial (por ejemplo en aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95% o más) o completa de dicha actividad de unión al receptor. Dicha “inhibición de la unión” puede determinarse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, preferentemente por cualquier método ejemplificado en el presente documento, por ejemplo ensayos de unión basados en ELISA.

Como se usa en el presente documento, el término “neutralizar” se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una proteína diana cuando una proteína de unión se une específicamente con la proteína diana. La neutralización puede ser el resultado de diferentes modos de unir dicha proteína de unión con la diana. Por ejemplo, la neutralización puede estar provocada por la unión de la proteína de unión en una región de la diana que no afecta a la unión del receptor con la molécula diana. Como alternativa la unión de una proteína de unión puede dar como resultado un bloqueo de la unión del receptor con la diana, neutralizando dicho bloqueo finalmente la actividad de la proteína diana. Cada uno de dichos mecanismos diferentes puede producirse de acuerdo con la invención. Preferentemente una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión con hRGM A da como resultado la neutralización de una actividad biológica de hRGM A. Preferentemente la proteína de unión neutralizante se une con hRGM A y reduce una actividad biológica de hRGM A en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La neutralización de una actividad biológica de hRGM A por una proteína de unión neutralizante, puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hRGM A bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la neutralización de hRGM A invierte la inhibición en un ensayo de extensión neuronal de Ntera (véase Ejemplo 3, posterior). El ensayo de crecimiento de neuritas Ntera aborda la inhibición de la extensión de neuritas. En ausencia de una proteína o fragmento de RGM A inhibidor y en presencia del sustrato estimulante de extensión laminina, los agregados de Ntera neuronales muestran una red extensiva y densa de neuritas en extensión. RGM A o fragmentos de RGMA inhiben la extensión de neuritas, dando como resultado longitud y números de neuritas reducidos. Los antagonistas de RGM A bloqueadores de función o MAB como mAb 5F9 neutralizaron la actividad inhibidora de extensión de neuritas del fragmento de cadena ligera de hRGM A conjugado con fc potente (aminoácidos 47 - 168) de la proteína RGM A humana en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de diferentes neuronas Ntera humanas diferenciadas, dando como resultado un fuerte aumento de la longitud y los números de neuritas.

Se entiende que un “anticuerpo monoclonal neutralizante” como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que tras la unión con el antígeno específico son capaces de competir con e inhibir la unión del ligando natural para dicho antígeno. En una realización particular de la presente solicitud, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención son capaces de competir con RGM A por la unión con Neogenina y/o con BMP-2 y/o BMP-4, y de prevenir la actividad o función biológica de RGM A. En particular, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención son capaces de unirse con RGM A y prevenir la unión con Neogenina y/o con BMP-2 y/o BMP-4, y de prevenir la actividad o función biológica de RGM A. El término “actividad” incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A que se une con un antígeno de RGM A y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A cuya unión con hRGM A inhibe la actividad biológica de hRGM A, por ejemplo, como se determina en un ensayo de unión de hRGM A-Neogenina, ensayo de unión de hRGM A-BMP-2 o ensayo de unión de hRGM A-BMP-4 como se describe posteriormente en la sección experimental.

La actividad biológica de RGM A puede describirse como migración celular reguladora. Un ejemplo especial de la migración celular es el crecimiento de neuritas, que se ve impedido o inhibido por proteínas RGM A. Además se ha mostrado que las proteínas RGM modulan la actividad de proteínas de BMP. Ejemplos publicados en el presente documento describen una actividad sinérgica, potenciadora de proteínas RGM en la ruta de BMP en un lado y una actividad inhibidora de proteínas RGM en la ruta de BMP, que es importante para la regulación del metabolismo de hierro, regeneración de hueso y cartílago y en el SNC para remielinización y regeneración.

La expresión “epítipo” o “determinante antigénico” incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno con la que se une un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente con un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante detección de alteraciones en

las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

5 Se entiende que el término “ k_{on} ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

10 Se entiende que el término “ k_{off} ” como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación para disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

Se entiende que el término “ K_d ” como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

15 La expresión “proteína de unión marcada” como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que posibilita la identificación de la proteína de unión. Preferentemente, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión con un polipéptido de restos de biotilino que pueden detectarse por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos de biotilino; epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores epitópicos); y agentes magnéticos, tales como quelados de gadolinio.

20 La expresión “conjugado de anticuerpo” se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida químicamente con un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto preparado a partir de materiales biológicos. Preferentemente los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero sin limitación, toxina de pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

30 Los términos “cristal” y “cristalizado” como se usa en el presente documento, se refieren a un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices regulares, repetidas, tridimensionales de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales se disponen de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se entienden bien en el campo. La unidad fundamental, o componente básico, que se repite en un cristal se denomina la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se adapta a una simetría cristalográfica bien definida, dada, proporciona la “celda unitaria” del cristal. La repetición de la celda unitaria por traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).”

40 El término “polinucleótido” como se indica en el presente documento significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de uno de los tipos de nucleótidos. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN pero preferentemente es ADN bicatenario.

55 La expresión “polinucleótido aislado” como se usa en el presente documento significa un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el “polinucleótido aislado” no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido con el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza; está unido operativamente con un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza; o no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

60 Se entiende que el término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por

ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replica junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma usada más habitualmente del vector. Sin embargo, se entiende que la invención incluye otras formas tales de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión “unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite actuar de su manera pretendida. Una secuencia de control “unida operativamente” con una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias “unidas operativamente” incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. La expresión “secuencia de control de la expresión” como se usa en el presente documento se refiere a secuencias polinucleotídicas, que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes con las que se ligan. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencias consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad proteica; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión a ribosomas, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en general, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Se entiende que la expresión “secuencias de control” incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias compañeras de fusión.

La “transformación”, como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso por el que ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede producirse en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de las secuencias de ácido nucleico ajenas en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, pero sin limitación, infección viral, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Dichas células “transformadas” incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado tiene capacidad de replicación bien como un plásmido de replicación autónoma o bien como parte del cromosoma hospedador. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o ARN insertado durante periodos de tiempo limitados.

Se entiende que la expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Debería entenderse que se pretende que dichos términos se refieran no solamente a la célula objeto particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún está incluida dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en el presente documento. Preferentemente las células hospedadoras incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Las células hospedadoras más preferentemente incluyen pero sin limitación la línea celular procariota *E. coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insectos Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se consigue habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y los procedimientos anteriores pueden realizarse en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en este campo y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en el presente documento por referencia para cualquier fin.

“Organismo transgénico”, como se conoce en la técnica y como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en el que el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa de forma natural en el organismo. Un “transgén” es una construcción de ADN, que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula de la que se

desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

5 Los términos “regular” y “modular” se usan indistintamente y, como se usa en el presente documento, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). La modulación puede ser un aumento o una reducción en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Las actividades ejemplares y funciones de una molécula incluyen, pero sin limitación, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares, y transducción de señal.

10 Consecuentemente, el término “modulador”, como se usa en el presente documento, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). Por ejemplo, un modulador puede provocar un aumento o una reducción de la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. El término “agonista”, como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero sin limitación, polipéptidos de hRGM A o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se una con hRGM A. El término “antagonista” como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés
15 provoca una reducción en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas ejemplares incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Se describen pepticuerpos, por ejemplo, en el documento WO01/83525.

25 Antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hRGM A. Los antagonistas de hRGM A pueden incluir, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula, que se una con hRGM A, como anticuerpos monoclonales que interactúan con la molécula de RGM A. Debería observarse que la interacción con RGM A puede dar como resultado una unión y neutralización de otros ligandos/componentes de membrana celular y puede ser útil para el funcionamiento aditivo o
30 sinérgico contra múltiples enfermedades.

Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o aliviar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, evitar el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, evitar la reaparición, el desarrollo, la aparición o
35 progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

El término “muestra”, como se usa en el presente documento, se usa en su sentido más amplio. Una “muestra biológica”, como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o un ser anteriormente vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, orina, el líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

2. Polipéptidos que se unen con hRGM A

45 La principal realización de la presente solicitud comprende anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente con al menos un epítipo de una proteína RGM A. Los anticuerpos aislados que se unen específicamente con al menos un epítipo de una proteína RGM A son capaces de inhibir la unión de RGM A con su receptor Neogenina y/o con proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

50 La realización más preferida de la presente solicitud comprende anticuerpos que se unen con RGM A o partes de unión a antígeno o fragmentos de los mismos.

Preferentemente, los anticuerpos anti-RGM A de la presente invención muestran una alta capacidad para reducir o
55 para neutralizar la actividad de RGM A, por ejemplo, como se evalúa por uno de varios ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica o descritos posteriormente.

La presente solicitud comprende más preferentemente anticuerpos monoclonales neutralizantes contra RGM A, que evitan selectivamente la unión de RGM A con su receptor Neogenina y con proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4) y la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizante contra RGM A, que evita selectivamente
60 la unión de RGM A con sus co-receptores las proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

Preferentemente, el anticuerpo neutralizante monoclonal de la presente solicitud es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. La expresión “anticuerpo humano” se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes a, o derivadas de, secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, véase en Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de
65

Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH nº 91-3242, 1991). Los anticuerpos humanos de la presente solicitud, sin embargo, pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por tanto, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3.

5 En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos neutralizantes más preferidos de la presente solicitud se denominan en este documento mAb5F9 y fragmentos anticuerpos funcionales de los mismos, y otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales con propiedades equivalentes a mAb5F9, tales como unión de alta afinidad con RGM A con baja cinética de disociación y alta capacidad neutralizante, se pretende que sean parte de la presente invención. La afinidad de unión y tasa de disociación de un anticuerpo anti-RGM A de la presente solicitud con un polipéptido de RGM A inmunogénico o fragmento del mismo, puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede medirse por ELISA competitivos, c RIAs, BIAcore o tecnología de KinExA. La tasa de disociación también puede medirse por BIAcore o tecnología KinExA. La afinidad de unión y tasa de disociación se miden por resonancia de plasmón superficial usando, por ejemplo, un BIAcore.

Uno de los anticuerpos monoclonales preferidos de la presente solicitud, el anticuerpo mAb5F9, tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEC ID N°: 9 o 34 y una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEC ID N°: 10.

También se entiende que los anticuerpos monoclonales aislados que interaccionan con la RGM A de la presente solicitud pueden ser una proteína de unión glucosilada donde el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende uno o más restos de carbohidratos. La producción de proteínas *in vivo* nacientes puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, pueden añadirse restos de azúcares (glucosilo) enzimáticamente, un proceso conocido como glucosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente se conocen como proteínas glucosiladas o glucoproteínas. La glucosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Organismos diferentes pueden producir enzimas de glucosilación diferentes (por ejemplo, glucosil transferasas y glucosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glucosilación de proteínas, y la composición de restos de glucosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína particular. Los restos de glucosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente la proteína de unión glucosilada comprende restos de glucosilo de modo que el patrón de glucosilación sea humano.

Los anticuerpos de la presente solicitud comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgY o IgD. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, bien una región constante de cadena ligera kappa o bien una región constante de cadena ligera lambda. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Como alternativa, la parte de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv monocatenario. Se conocen en la técnica reemplazos de restos de aminoácidos en la parte en Fc para alterar la función efectora del anticuerpo (Winter, *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; 5.624.821). La parte Fc de un anticuerpo media en varias funciones efectoras importantes por ejemplo inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida/tasa de eliminación del anticuerpo y complejos de antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso deletéreas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3, median en la ADCC y CDC mediante unión con Fc γ Rs y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores de Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la semivida en circulación de los anticuerpos. En otra realización más al menos un resto de aminoácido se reemplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de modo que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

3. Generación de anticuerpos anti hRGM A

3.1. General

Pueden generarse anticuerpos de la solicitud mediante inmunización de un hospedador adecuado (por ejemplo, vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos, reptiles, peces, anfibios y en huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de la presente solicitud, el hospedador se inmuniza con un polipéptido de RGM A inmunogénico o fragmento del mismo de la invención. El término "inmunización" se refiere en el presente documento al proceso de presentar un antígeno a un repertorio inmunitario si ese repertorio existe en un organismo no alterado genéticamente natural, o un organismo transgénico, incluyendo los modificados para presentar un repertorio inmunitario humano artificial. De forma similar, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene adyuvantes y otros aditivos que potenciarían la inmunogenicidad del antígeno.

Puede realizarse inmunización de animales por cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Se conocen bien en la técnica métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane y Patente de Estados Unidos N° 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno de RGM A se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, repartidas durante varias semanas.

Se contempla que el hospedador animal se inmuniza con el antígeno asociado con la membrana celular de una célula intacta o rota y se identifican anticuerpos de la presente solicitud uniendo con un polipéptido inmunogénico de la invención. Después de inmunización del hospedador animal con el antígeno, pueden obtenerse anticuerpos del animal. El suero que contiene anticuerpos se obtiene del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero puede usarse como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero o los anticuerpos pueden purificarse del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, teniendo por lo tanto una disposición heterogénea de propiedades.

3.2 Anticuerpos monoclonales anti RGM A usando tecnología de hibridoma

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en este campo incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (dichas referencias incorporadas por referencia en sus totalidades). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no está limitada a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método por el que se produce.

Los métodos para producir y explorar con respecto a anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica. En una realización, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención donde, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y explorando después los hibridomas resultantes de la fusión con respecto a clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse con un polipéptido de la invención. Brevemente, pueden inmunizarse ratones con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el antígeno de RGMA se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos adyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulen al hospedador para secretar factores que sean quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, repartidas durante varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno RGMA en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitante. Los clones de hibridomas se ensayan después por métodos conocidos en la técnica con respecto a células que secretan anticuerpos capaces de unirse con RGMA. Puede generarse líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra realización, pueden prepararse hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos del animal inmunizado. Después de inmunización, el animal se sacrifica y los linfocitos B esplénicos se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de fusión y selección por antibióticos, los hibridomas se exploran usando RGM A, o una parte de la misma, o una célula que expresa RGM A. En una realización preferida, la exploración inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA. Se proporciona un ejemplo de exploración por ELISA en el documento WO 00/37504, incorporado en el presente documento por referencia.

Se seleccionan hibridomas productores de anticuerpos anti RGM A, se clonan y se exploran adicionalmente con respecto a características deseables, incluyendo crecimiento de hibridomas robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se analiza adicionalmente posteriormente. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carezcan de un sistema inmunitario, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los expertos habituales en la materia conocen bien métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana, no de ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que se fusiona un mieloma no secretor humano con una célula humana que expresa un anticuerpo anti RGM A.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

3.3 Anticuerpos monoclonales anti RGM A usando SLAM

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos aislados, individuales, usando un procedimiento denominado en la técnica método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.627.052, Publicación de PCT WO 92/02551 y Babcock, J. S. *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848. En este método, se exploran células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos anteriormente, usando un ensayo de placas hemolíticas específico de antígeno, donde el antígeno RGM A, una subunidad de RGM A o un fragmento de los mismos, se acopla con glóbulos rojos de ovejas usando un enlazador, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por RGM A. Después de la identificación de células secretoras de anticuerpos de interés, se rescatan ADNc de región variable de cadena pesada y ligera de las células por PCR de transcriptasa inversa y después pueden expresarse estas regiones variables, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse después a análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo seleccionando las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos para RGM A. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse además *in vitro*, tal como por métodos de maduración de afinidad *in vitro* tales como los descritos en la Publicación de PCT WO 97/29131 y la Publicación de PCT WO 00/56772.

3.4 Anticuerpos monoclonales anti RGM A usando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, se producen anticuerpos inmunizando un animal no humano que comprende algo, o todo, del locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada técnicamente que comprende fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en producción de anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green *et al.* Nature Genetics 7: 13-21 (1994) y Patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véase también documento WO 91/10741, publicado el 25 de julio de 1991, WO 94/02602, publicado el 3 de febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de octubre de 1996, WO 98/16654, publicado el 23 de abril de 1998, WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, WO 98/50433, publicado el 12 de noviembre de 1998, WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre de 1999, WO 99/53049, publicado el 21 de octubre de 1999, WO 00 09560, publicado el 24 de febrero de 2000 y WO 00/037504, publicado el 29 de junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera Mab humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal, de tamaño de megabases, de los loci de cadena pesada humana y x loci de cadena ligera. Véase Mendez *et al.*, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998), cuyas divulgaciones se incorporan por la presente por referencia.

3.5 Anticuerpos monoclonales anti RGM A usando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También pueden usarse métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, donde una biblioteca de anticuerpos se explora para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión deseada. Se conocen bien en la técnica métodos para dicha exploración de bibliotecas de anticuerpos recombinantes e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en Ladner *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Kang *et al.* Publicación de PCT N° WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación de PCT N° WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación de PCT N° WO

92/20791; Markland *et al.* Publicación de PCT N° WO 92/15679; Breittling *et al.* Publicación de PCT N° WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación de PCT N° WHO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación de PCT N° WO 92/09690; 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; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226: 889-896; Clackson *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; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88: 7978-7982, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20030186374 y Publicación de PCT N° WO 97/29131, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con RGM A, o una parte de RGM A. Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto sin tratamiento previo, es decir, uno que se ha inmunizado con RGM A, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no se ha inmunizado con RGM A humano. Los anticuerpos de la invención se seleccionan explorando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RGM A humano para seleccionar de este modo los anticuerpos que reconocen RGM A. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar dicha exploración y selección, tales como los descritos en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tengan afinidades de unión particulares por hRGM A, tales como los que se disocian de RGM A humano con la constante de velocidad k_{off} particular, el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial puede usarse para seleccionar anticuerpos que tengan la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tengan una actividad neutralizante particular para hRGM A, tales como los que tienen una CI_{50} particular, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hRGM A.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une con RGM A humana. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En uno particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une con el antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo dominios de unión a fd y M13 expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpo Fv estabilizados por disulfuro fusionados de forma recombinante con la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); solicitud de PCT N° PCT/GB91/01134; publicaciones de PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780. 225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Como se ha descrito en las referencias anteriores, después de selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle posteriormente. Por ejemplo, pueden emplearse también técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); y Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043 (1988) (dichas referencias incorporadas por referencia en su totalidad). Los ejemplos de técnicas que puede usarse para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen las descritas en las Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988).

Como alternativa a la exploración de bibliotecas de anticuerpos recombinantes por presentación de fagos, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para explorar bibliotecas combinatorias grandes a la identificación de anticuerpos de especificidad doble de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en la Publicación de PCT N° 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, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica por traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que portan puromicina, un antibiótico

aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o la proteína codificados, por ejemplo, anticuerpo o parte del mismo, tal como unión del anticuerpo, o parte del mismo, con el antígeno de especificidad doble. Pueden expresarse secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o partes de los mismos, recuperarse de la exploración de dichas bibliotecas mediante medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, pueden someterse a maduración de afinidad adicional por ciclos adicionales de exploración de fusiones de ARNm-péptido en los que se han introducido mutaciones en la secuencia o las secuencias originalmente seleccionadas, o por otros métodos para modulación de afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En métodos de presentación en levadura, se usan métodos genéticos para unir el dominio de anticuerpo con la pared celular de levadura y presentarlos en la superficie de levadura. En particular, dicha levadura puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los ejemplos de métodos de presentación de levadura que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los desvelados en Wittrup, *et al.* Patente de Estados Unidos N° 6.699.658 incorporado en el presente documento por referencia.

4. Producción de anticuerpos de RGM A recombinante particulares de la invención

Pueden producirse anticuerpos de la presente invención por cualquiera de varias técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, la expresión de células hospedadoras, donde la expresión del vector o los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecta o se transfectan en una célula hospedadora por técnicas convencionales. Se entiende que las diversas formas del término "transfección" abarcan una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una células hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección de DEA-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente en células hospedadoras de mamífero, porque es más probable que dichas células eucariotas (y en particular células de mamífero) en lugar de células procariotas se ensamblen y secreten un anticuerpo plegado en forma apropiada e inmunológicamente activo.

Las células hospedadoras del mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Pueden recuperarse anticuerpos del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

También pueden usarse células hospedadoras para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifique fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para retirar algo de, o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión con los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés por entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químicos convencionales.

En un sistema preferido para expresión recombinante de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpo se introduce en células dhfr-CHO por transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen cada uno operativamente con elementos reguladores potenciador de CMV/promotor de AdMLP para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación por metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Además la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando

una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

5 **4.1 Anticuerpos anti RGM A**

La Tabla 5 es una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti hRGM A preferidos de la invención.

10 TABLA 5: LISTA DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE REGIONES VH Y VL DE ANTICUERPOS ANTI hRGM A 5f9

| SEC ID N° | Región proteica | | Secuencia |
|-----------|-----------------|--------------------------------|---|
| | | | 123456789012345678901234567890 |
| | | | 123456789012345678901234567890 |
| 34 | VH 5F9 | | EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSQVAVSGFTFS NYGMNWIROAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLEMSLRSSE TAIYCAKGTTPDYWGQGVMTVSS |
| 57 | VH 5F9 CDR-H1 | Restos 31-35 de SEC ID N°: 34 | NYGMN |
| 58 | VH 5F9 CDR-H2 | Restos 50-66 de SEC ID N°: 34 | MIYYDSSEKHYADSVKG |
| 59 | VH 5F9 CDR-H3 | Restos 99-104 de SEC ID N°: 34 | GTPDY |
| 10 | VL 5F9 | | DVVLVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLE YSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFIGSGSGTDFTLKIISRVPEPDLGV YYCFQATHDPLTFIGSGTKLEIKR |
| 60 | VL 5F9 CDR-L1 | Restos 24-39 de SEC ID N°: 10 | RSSQSLEYSDGYTFLE |
| 61 | VL 5F9 CDRL2 | Restos 55-61 de SEC ID N°: 10 | EVSNRFS |
| 62 | VL 5F9 CDRL3 | Restos 94-102 de SEC ID N°: 10 | FQATHDPLT |

15 Las secuencias de CDR del anticuerpo anti RGM A aisladas anteriores establecen una nueva familia de proteínas de unión a RGM A, aisladas de acuerdo con la presente invención. Para generar y seleccionar CDR de la invención que tengan actividad de unión y/o neutralizante de RGM A preferida con respecto a hRGM A, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente invención y evaluar las características de unión y/o neutralización de RGM A de esas proteínas de unión, incluyendo pero sin limitación las descritas específicamente en el presente documento.

20 **4.2 Anticuerpos quiméricos anti RGM A**

25 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger *et al.*, 1984, Nature 312: 604-608; Takeda *et al.*, 1985, Nature 314: 452-454 que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad) cortando y empalmado genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada.

35 En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen reemplazando la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti RGM A humano descritos en el presente documento con una región constante de IgG1 humana.

4.3 Anticuerpos con injertos de CDR anti RGM A

40 Los anticuerpos con injertos de CDR de la invención comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano donde una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L se reemplazan con secuencias de CDR de anticuerpos no humanos, como por ejemplo murinos, de la invención. Una secuencia marco conservada de cualquier anticuerpo humano puede actuar como el molde para injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de cadena directo en dicho marco conservado conduce con frecuencia a alguna pérdida de la afinidad de unión con el

antígeno. Cuanto más homólogo sea un anticuerpo humano con respecto al anticuerpo murino original, menos probable es la posibilidad de que la combinación de las CDR murinas con el marco conservado humano introduzca distorsiones en las CDR que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, es preferible que el marco conservado variable humano que se selecciona para reemplazar el marco conservado variable murino aparte de las CDR tenga al menos 65% de identidad de secuencia con el marco conservado de región variable de anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 80% de identidad de secuencia. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos con injertos de CDR (Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Patente de Estados Unidos N° 5.225.539). En una realización específica la invención proporciona anticuerpos con injertos de CDR con cadenas V_H y/o V_L como se describen en la Tabla 6.

TABLA 6: ANTICUERPOS CON INJERTOS DE CDR

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|---|--|---|
| | | 123456789012345678901234567890 |
| 35 (15) (16) (17) (18) | VH 5F9.1-GL (VH3-48/JH3 FR1) (VH3-48/JH3 FR2) (VH3-48/JH3 FR3) (VH3-48/JH3 FR4) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDED TAVYYCARG TPDYWGQGT MTVTSS |
| 36 (15) (16) (17) (19) | VH 5F9.2-GL (VH3-48/JH4 FR1) (VH3-48/JH4 FR2) (VH3-48/JH4 FR3) (VH3-48/JH4 FR4) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDED TAVYYCARG TPDYWGQGT LVTVSS |
| | | 123456789012345678901234567890 |
| 37 (15) (16) (17) (20) | VH 5F9.3-GL (VH3-48/JH6 FR1) (VH3-48/JH6 FR2) (VH3-48/JH6 FR3) (VH3-48/JH6 FR4) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDED TAVYYCARG TPDYWGQGT TVTSS |
| 38 (21) (22) (23) (18) | VH 5F9.4-GL (VH3-33/JH3 FR1) (VH3-33/JH3 FR2) (VH3-33/JH3 FR3) (VH3-33/JH3 FR4) | QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TPDYWGQGT MTVTSS |
| 39 (21) (22) (23) (19) | VH 5F9.5-GL (VH3-33/JH4 FR1) (VH3-33/JH4 FR2) (VH3-33/JH4 FR3) (VH3-33/JH4 FR4) | QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TPDYWGQGT LVTVSS |
| 40 (21) (22) (23) (20) | VH 5F9.6-GL (VH3-33/JH6 FR1) (VH3-33/JH6 FR2) (VH3-33/JH6 FR3) (VH3-33/JH6 FR4) | QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TPDYWGQGT TVTSS |
| 41 (24) (25) (26) (18) | VH 5F9.7-GL (VH3-23/JH3 FR1) (VH3-23/JH3 FR2) (VH3-23/JH3 FR3) (VH3-23/JH3 FR4) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK TPDYWGQGT MTVTSS |
| 42 (24) (25) (26) (19) | VH 5F9.8-GL (VH3-23/JH4 FR1) (VH3-23/JH4 FR2) (VH3-23/JH4 FR3) (VH3-23/JH4 FR4) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK TPDYWGQGT LVTVSS |
| 43 (24) (25) (26) (20) | VH 5F9.9-GL (VH3-23/JH6 FR1) (VH3-23/JH6 FR2) (VH3-23/JH6 FR3) (VH3-23/JH6 FR4) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK TPDYWGQGT TVTSS |

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|--|--|---|
| 44 (27) (28) (29) (30) | VL 5F9.1-GL (A18/JK2 FR1) (A18/JK2 FR2) (A18/JK2 FR3) (A18/JK2 FR4) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 45 (31) (32) (33) (30) | VL 5F9.2-GL (A17/JK2 FR1) (A17/JK2 FR2) (A17/JK2 FR3) (A17/JK2 FR4) | DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 46 (31) (28) (29) (30) | VL 5F9.3-GL (A17/JK2 FR1) (A18/JK2 FR2) (A18/JK2 FR3) (A18/JK2 FR4) | DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| Las secuencias de CDR derivadas del mAb 5F9 se indican en letras en negrita. También se hace referencia a las secuencias marco conservadas específicas (FR1 a FR4) indicando las SEC ID N° correspondientes (véase también Tablas 3 y 4) | | |

4.4 Anticuerpos humanizados anti RGM A

- 5 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especie no humana que se unen con el antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana. Se desvelan secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/online-comp.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcent-er/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/aw-ic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.ic-net.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links1.html; www.recab.:unihd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.bios-ci.missouri.edu/smithgip/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr.roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), incorporada cada una en su totalidad en el presente documento por referencia. Dichas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, la afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidez, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- Los restos marco conservados en las regiones marco conservadas humanas pueden sustituirse con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco conservado se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelización de las interacciones de los restos de CDR y marco conservado para identificar restos de marco conservado importantes para la unión a antígenos y comparación de secuencias para identificar restos de marco conservado poco habituales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los expertos en la materia están familiarizados con modelos de inmunoglobulina tridimensionales que están disponibles habitualmente. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de las secuencias consenso y de importación de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia en la unión a antígeno. Los anticuerpos

pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en este campo, tales como pero sin limitación las descritas en Jones *et al.*, Nature 321: 522 (1986); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151: 2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska. *et al.*, PNAS 91: 969-973 (1994); publicación de PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, documentos US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592.106; EP 519.596, EP 239.400, Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567, cada una incorporada en su totalidad en el presente documento por referencia, incluyendo referencias citadas en las mismas.

5. Realizaciones adicionales de anticuerpos de la invención

5.1 Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

La presente solicitud también describe un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que puede prepararse que comprende todo o una parte de un anticuerpo de RGM A de la presente solicitud unido con otro polipéptido. En algunas realizaciones, solamente la región variable del anticuerpo de RGM está unida con el polipéptido. En otras realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo de RGM A de la presente solicitud está unido con un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo está unido con un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera que permite que los dominios VH y VL interaccionen entre sí para formar un sitio de unión a anticuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH se separa del dominio VL por un enlazador que permite que los dominios VH y VL interaccionen entre sí (véase posteriormente en Anticuerpos Monocatenarios). El anticuerpo de VH –enlazador- VL se une después con un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o un tejido que expresa una RGM A. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima; que puede visualizarse fácilmente, tal como peroxidasa de rábano rusticano. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos monocatenarios se unen entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada donde un anticuerpo o una parte de anticuerpo de la presente solicitud se derivatiza o se une con otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la presente solicitud puede derivarse uniendo funcionalmente un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente solicitud (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares, tales como un ácido nucleico, otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o una parte de anticuerpo de la presente solicitud puede derivatizarse incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa y similares. Cuando se derivatiza un anticuerpo con una enzima detectable, esta se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano rusticano, la adición de peróxido de hidrógeno y daminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con un ácido nucleico, biotina, y detectarse mediante la medición indirecta de unión a avidina o estreptavidina.

5.2 Anticuerpos monocatenarios

La presente solicitud incluye un anticuerpo monocatenario (scFv) que se une con una RGM A inmunogénica de la invención. Para producir el scFv, el ADN que codifica VH y V se une operativamente con ADN que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de modo que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-42 6; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, 30 Nature (1990) 34 8: 552-554). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si se usa solamente una única VH y VL, bivalente, si se usan dos VH y VL, o polivalente, si se usan más de dos VH y VL. Dos de dichos fragmentos scFv acoplados mediante un enlazador se denominan "diacuerpos" cuya forma también está abarcada por la invención.

5.3 Anticuerpos biespecíficos

La presente solicitud incluye además un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que una especificidad es por un polipéptido de RGM A inmunogénico de la presente solicitud. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo biespecífico que se une específicamente con un polipéptido de RGM A inmunogénico de la invención mediante un dominio de unión y con una segunda molécula mediante una segunda adición de dominio de unión, puede generarse un anticuerpo monocatenario que contiene más de un VH y VL que se une específicamente con un polipéptido inmunogénico de la invención y con otra molécula que se asocia con la atenuación del colapso del cono de crecimiento mediado por mielina y la inhibición de la extensión y el brote de neuritas. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que se conocen bien por ejemplo, Fanger *et al.* Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (mencionado anteriormente).

En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se preparan usando una o más de las regiones variables de un anticuerpo de la invención. En otra realización, el anticuerpo biespecífico se prepara usando una o más regiones CDR de dicho anticuerpo.

5.4 Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la presente solicitud puede derivatizarse o unirse con otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se derivatiza de modo que la unión con un polipéptido inmunogénico de la invención no se ve afectada de forma adversa por la derivatización o el marcaje.

Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente solicitud puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares adicionales, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que pueda mediar en la asociación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina). Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes o adicionales. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo de estreptavidina para realizar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C terminal para realizar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov *et al.* (1994) Molecular Immunology 31: 1047-1058). Pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpo completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

Puede producirse un anticuerpo derivatizado por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster) u homobifuncionales (por ejemplo, disuccinimidil suberato). Dichos enlazadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado también puede ser un anticuerpo marcado. Por ejemplo, los agentes de detección con los que un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede derivatizarse son compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, fluoresceín isotiocianato, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonil cloruro, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano rusticano, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosaoxidasa y similares. En realizaciones que están marcadas con una enzima detectable, el anticuerpo se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse mediante medición indirecta de la unión con avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominio de unión a metales, epítipo: marcadores). Un anticuerpo de RGM A o un fragmento antigénico del mismo también puede marcarse con un aminoácido radiomarcador. El radiomarcador también puede usarse para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos. El anticuerpo de RGM A radiomarcado puede usarse como diagnóstico, por ejemplo, para determinar los niveles de receptor de RGM A en un sujeto. Además, el anticuerpo de RGM A radiomarcado puede usarse de forma terapéutica para tratar una lesión de la médula espinal.

Los ejemplos de los marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm. Un anticuerpo de RGM A o un fragmento antigénico del mismo también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo

metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero o para aumentar la unión tisular. Además, un marcador para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, ADN para detección por PCR, o potenciación de la expresión génica, o ARNip para suprimir la expresión génica en células o tejidos portadores de RGM A.

5 La clase y subclase de anticuerpos de RGM A pueden determinarse por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo pueden determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de un anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles en el mercado. La clase y subclase pueden determinarse por ELISA, Transferencia de Western así como otras técnicas. Como alternativa, la clase y subclase pueden determinarse secuenciando todos o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

15 **5.5 Inmunoglobulinas de dominio variable doble**

Las proteínas o inmunoglobulinas de unión a dominio variable doble (DVD) como se usa en el presente documento, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión multivalentes, como por ejemplo divalentes y tetravalentes. La expresión "proteína de unión multivalente" se usa en la presente memoria descriptiva para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente se modifica de forma técnica preferentemente para tener dos o más sitios de unión a antígeno y en general no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unir dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir capaces de unirse con un antígeno o multiespecíficos, es decir capaces de unirse con dos o más antígenos. Las proteínas de unión a DVD que comprenden dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera se denominan una Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada y un polipéptido de DVD de cadena ligera y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con total de 6 CDR implicadas en el la unión del antígeno por cada sitio de unión a antígeno. Se desvelan proteínas de unión a DVD y métodos para preparar proteínas de unión a DVD en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/507.050 e incorporada en el presente documento por referencia. Se pretende que la presente invención comprenda una proteína de unión a DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse con RGM A. Preferentemente, la proteína de unión a DVD es capaz de unir RGM A y una segunda diana. La segunda diana se selecciona del grupo que consiste en actividades de MAB antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF alfa/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, proteína básica de Plaquetas (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), de proteínas mediadoras de transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL), de otros MAB neuroregenerativos (NgR, Lingo, p75, CSPG (por ejemplo NG-2, neurocano, brevicano, versicano, agregcano) ácido hialurónico, mAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecano, neurocano, fosfacano, nogo-A; OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, plexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), de actividades de MAB neuroprotectoras (EGF, EGFR, Sema 3), de MAB anti beta amiloide (por ejemplo, m266, 3D6 (bapineuzumab), MAB anti globulómero 7C6), de receptores y transportadores localizados en el SNC (receptores de serotonina, dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

45 **5.6 Anticuerpos específicos dobles**

La presente solicitud también describe tecnología de "anticuerpos específicos dobles". Los anticuerpos específicos dobles pueden actuar como agonistas, antagonistas o ambos en diferentes combinaciones. Los anticuerpos específicos dobles son anticuerpos en los que la cadena VH se une con un primer antígeno y la cadena VL se une con otro antígeno como se ejemplifica en el documento WO2008082651.

5.7 Anticuerpos cristalizados

Otra realización de la presente solicitud proporciona una proteína de unión cristalizada. El término "cristalizado" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos de matrices tridimensionales, repetidas, regulares, de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos) o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales se disponen de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se entienden bien en el campo. La unidad fundamental, o componente básico, que se repite en un cristal se denomina la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se adapta a una simetría cristalográfica bien definida dada, proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria en traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2ª ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

Preferentemente la presente solicitud describe cristales de anticuerpos de RGM A completos y fragmentos de los mismos como se desvela en el presente documento, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de la proteína de unión. En otra realización la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

Puede producirse proteína de unión cristalizada de la invención de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se desvela en el documento WO 02072636, incorporado en el presente documento por referencia.

5.8 Anticuerpos glucosilados

Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión glucosilada donde el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo comprenden uno o más restos de carbohidrato. La producción de proteína *in vivo* naciente puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, pueden añadirse restos de azúcar (glucosilo) enzimáticamente, un proceso conocido como glucosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glucosiladas o glucoproteínas. Los anticuerpos son glucoproteínas con uno o más restos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los restos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un importante efecto en la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo en la unión a antígeno o semivida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11-16). Por el contrario, la glucosilación del dominio variable puede tener un efecto en la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glucosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361- 1367), o da como resultado afinidad aumentada por el antígeno (Wallick, S. C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168: 1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10: 717 2723).

Un aspecto de la presente invención se dirige a generar mutantes de sitios de glucosilación en los que el sitio de glucosilación unido a O o N de la proteína de unión se ha mutado. Un experto en la materia puede generar dichos mutantes usando tecnologías bien conocidas convencionales. Los mutantes de sitio de glucosilación que conservan la actividad biológica pero tienen actividad de unión aumentada o reducida son otro objeto de la presente invención.

En otra realización más, la glucosilación del anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención se modifica. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglucosilado (es decir el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden conseguirse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de región variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicho aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe en más detalle en la publicación de PCT WO2003016466A2 y las Patentes de Estados Unidos N° 5.714.350 y 6.350.861, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Adicionalmente o como alternativa, puede prepararse un anticuerpo modificado de la invención que tiene un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc de bisección aumentadas. Dichos patrones de glucosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden conseguirse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito células con maquinaria de glucosilación alterada en la técnica y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-1, así como Patente Europea N° EP 1.176.195; Publicaciones de PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La glucosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glucosilación (por ejemplo, glucosiltransferasas y glucosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glucosilación de proteínas, y la composición de restos de glucosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se exprese la proteína particular. Los restos de glucosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente la proteína de unión glucosilada comprende restos de glucosilo de modo que el patrón de glucosilación es humano.

Se conoce por los expertos en la materia que diferente glucosilación de proteínas puede dar como resultado diferentes características de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura, y glucosilada utilizando la ruta endógena de levadura puede reducirse en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea

celular CHO. Dichas glucoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y muestran semivida reducida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en seres humanos y otros animales pueden reconocer restos de glucosilo específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de proteínas, la solubilidad, la susceptibilidad a proteasas, el tráfico, el transporte, la compartimentalización, la secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, la antigenicidad o la alergenicidad. En consecuencia, un practicante puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glucosilación específicos, por ejemplo composición y patrón de glucosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de especie del animal objeto pretendido.

Puede conseguirse expresión de proteínas glucosiladas diferentes de las de una célula hospedadora modificando genéticamente la célula hospedadora para expresar enzimas de glucosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en este campo un practicante puede generar anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que muestran glucosilación de proteína humana. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glucosilación de origen no natural de modo que las proteínas glucosiladas (glucoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestren glucosilación de proteínas idéntica a la de células animales, especialmente células humanas (solicitudes de patente de Estados Unidos 20040018590 y 20020137134 y publicación de PCT WO2005100584 A2).

Además, se apreciará por un experto en la materia que una proteína de interés puede expresarse usando una biblioteca de células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para expresar diversas enzimas de glucosilación, de modo que células hospedadoras miembros de la biblioteca producen la proteína de interés con patrones de glucosilación variantes. Un practicante puede después seleccionar y aislar la proteína de interés con nuevos patrones de glucosilación particulares. Preferentemente, la proteína que tiene un patrón de glucosilación nuevo particularmente seleccionado muestra propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9 Anticuerpos anti-idiotípicos

Además de las proteínas de unión, la presente invención también se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para dichas proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión de antígeno de otro anticuerpo. El animal anti-Id puede prepararse inmunizando un animal con la proteína de unión o una región que contiene CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá, y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también puede usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

6. Usos de los anticuerpos

Dada su capacidad para unirse con RGM A humana, los anticuerpos neutralizantes de la presente solicitud, o partes de los mismos, pueden usarse para detectar RGM A humana (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La presente solicitud proporciona un método para detectar RGM A humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención y detectar bien el anticuerpo (o parte del anticuerpo) unido con RGM A humana o bien anticuerpo no unido (o parte del anticuerpo), para detectar de este modo RGM A humana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales presentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, fluoresceín isoticianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluye ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{11}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm .

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente solicitud son preferentemente capaces de neutralizar la actividad de RGM A humana tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, dichos anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden usarse para inhibir la unión de RGM A con su receptor Neogenina, con BMP-2 y/o BMP-4, y de este modo inhibir la actividad resultante.

En otra realización, la presente solicitud proporciona un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto, provechosamente de un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno en el que la actividad resultante de RGM A es perjudicial. La presente solicitud proporciona métodos para reducir la actividad del RGM A en un sujeto que padece dicha enfermedad o trastorno, evitando la unión de RGM A con Neogenina, y/o BMP-2 y/o BMP-4, mediante el uso de los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud. Los anticuerpos de la presente solicitud, en particular los anticuerpos humanizados desvelados en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto

humano para fines terapéuticos. Además, los anticuerpos de la presente solicitud pueden administrarse a un mamífero no humano que expresa un RGM A con el que el anticuerpo es capaz de unirse para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a este último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y ciclos temporales de administración).

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión “un trastorno en el que la actividad de RGM A es perjudicial” incluye enfermedades y otros trastornos en los que se ha mostrado o se sospecha que la presencia de RGM A o su actividad resultante en un sujeto que padece trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno o es un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en el que la actividad de RGM A es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la reducción de la actividad de RGM A alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Los ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen los trastornos analizados en la sección posterior que se refiere a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Se reconoce que RGM A desempeña un papel importante en la patología asociada con una diversidad de enfermedades que implican enfermedades neurológicas asociadas con neurodegeneración o inhibición de procesos neuroregenerativos, dando como resultado parálisis. Esto incluye demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hiperkinesias, manías, Enfermedad de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión aguda, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, incluyendo Lesión Cerebral Traumática, Parálisis Cerebral, Guillain Barre, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia del Músculo Espinal, Tumores Espinales, Ictus y Miелitis Transversa.

Además, como se ha analizado previamente, pueden ser útiles inmunoglobulinas de DVD, o anticuerpos específicos dobles entre uno cualquiera de los compañeros descritos anteriormente. Dichas preparaciones de anticuerpos como se han descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, lesión nerviosa periférica, esquizofrenia, depresión, ansiedad, así como cualquier plasticidad y crecimiento de neuritas y enfermedad relacionada con neurotoxicidad citada anteriormente.

Los anticuerpos de la presente solicitud también pueden combinarse con péptidos que permiten que la transferencia transmembrana incluya dirección de proteínas diana intracelulares. Dichas secuencias peptídicas pueden incluir, pero sin limitación, tat, antennapedia, poli-argininas, algunos péptidos antimicrobianos. Dichos péptidos pueden permitir la transferencia a través de membranas, incluyendo membranas plasmáticas celulares, pero también membranas epiteliales y endoteliales, incluyendo la barrera hematoencefálica, mucosa intestinal, meninges y otras.

Un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la presente solicitud también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos de moléculas pequeñas adicionales útiles en el tratamiento de trastornos en los que la actividad del RGM A está implicada como se ha analizado en los párrafos anteriores. Debería entenderse que los anticuerpos de la presente solicitud o parte de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que se trate por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que transmita un atributo beneficioso a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

7. Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son para su uso en, pero sin limitación, diagnóstico, detección o control de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el control o el alivio de un trastorno o uno o más síntomas del mismo y/o en la investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de anticuerpos de la invención para tratar un trastorno en el que la actividad del RGM A es perjudicial. Preferentemente, los agentes profilácticos o terapéuticos que se sabe que son útiles para o que se han usado o se usan en la actualidad en la prevención, el tratamiento, el control o el alivio de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender además un vehículo, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente

documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian el periodo de validez o eficacia de un anticuerpo o parte de un anticuerpo.

Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, controlar, tratar o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración mucosa (por ejemplo vías intranasales y orales). Además, puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y Publicaciones de PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WHO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En una realización, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación o una composición de la invención se administra usando Alkermes AIR®, Tecnología de suministro de fármaco pulmonar (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, se administran agentes profilácticos o terapéuticos de la invención por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intratumoral, por vía oral, por vía intranasal, por vía pulmonar o por vía subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o por inyección de embolada, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área que necesite tratamiento. Esto puede conseguirse, por ejemplo, pero sin limitación, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tisseel®), o matrices de colágeno. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención antagonistas se administra por vía local al área afectada de un sujeto para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra por vía local una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención al área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, controlar y/o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede suministrarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, puede usarse una bomba para conseguir liberación controlada o sostenida (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para conseguir liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolenand Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véase también Levy *et al.*, 1985, Science 228:190; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Patente de Estados Unidos N° 5.679.377; Patente de Estados Unidos N° 5.916.597; Patente de Estados Unidos N° 5.912.015; Patente de Estados Unidos N° 5.989.463; Patente de Estados Unidos N° 5.128.326; Publicación de PCT N° WO 99/15154; y Publicación de PCT N° WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra realización más, un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse próximo a la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo por lo tanto solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionado anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Se analizan sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida

que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la Publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se haga intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase Patente de Estados Unidos N° 4.980.286) o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en enlace con un péptido de tipo caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natal. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868). Como alternativa, puede introducirse un ácido nucleico por vía intracelular e incorporarse dentro de ADN de células hospedadoras para expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero sin limitación, administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección.

Si las composiciones de la invención van a administrarse por vía tópica, las composiciones pueden formularse en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópica no pulverizables, se emplean típicamente formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferentemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que, si se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes adyuvantes (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizable donde el principio activo, preferentemente en combinación con un vehículo inerte, sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un producto volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco flexible. También pueden añadirse hidratantes o humectantes a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dichos ingredientes adicionales.

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma de aerosol, pulverización, bruma o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación en pulverización de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (compuesto de, por ejemplo, gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sobrecitos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitación, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto

seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes saporíferos, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de un agente o agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y Publicaciones de PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación y/o composición de la invención se administra usando tecnología de suministros del fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender administración de una composición formulada para administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua sin pirógenos estéril) antes de su uso. Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

En general, los ingredientes de composiciones se proporcionan bien por separado o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado de forma hermética tal como una ampolla o un sobrecito que indique la cantidad del agente activo. Cuando el modo de administración sea infusión, la composición puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de uso farmacéutico estéril. Cuando el modo de administración sea por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona que uno o más de los agentes terapéuticos o profilácticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se envasen en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobrecito que indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan como un polvo liofilizado estéril seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente y puede reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferentemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o composiciones farmacéuticas de la invención deberían almacenarse a entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deberían administrarse en un intervalo de 1 semana, preferentemente en un intervalo de 5 días, en un intervalo de 72 horas, en un intervalo de 48 horas, en un intervalo de 24 horas, en un intervalo de 12 horas, en un intervalo de 6 horas, en un intervalo de 5 horas, en un intervalo de 3 horas o en un intervalo de 1 hora después de reconstituirse. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente. Preferentemente, la forma líquida de la composición administrada se proporciona en un recipiente sellado herméticamente de al menos 0,25 mg/ml, más preferentemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos

50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debería almacenarse a entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original.

5 Los anticuerpos y partes de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferentemente, el anticuerpo o partes de anticuerpos se prepararán como una solución inyectable que contiene anticuerpo 0,1-250 mg/ml. La solución inyectable puede estar compuesta de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de sílex o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero sin limitación, succinato sódico, citrato sódico, fosfato sódico o fosfato potásico.

10 El cloruro sódico puede usarse para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa 0-10% (óptimamente 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de masificación para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol 1-10% (óptimamente 2-4%). Pueden usarse estabilizadores en formas de dosificación tanto

15 líquidas como liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de masificación adecuados incluyen glicina, arginina, pueden incluirse como polisorbato-80 0-0,05% (óptimamente 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero sin limitación polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención preparados como una solución inyectable para administración parenteral pueden comprender además un agente útil como un

20 adyuvante, tal como los usados para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de administración parental, particularmente administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de inyección (es decir, mayores de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, y mínima incidencia de las reacciones de

25 sitio de inyección (véase documentos WO2004078140, US2006104968 incorporados en el presente documento por referencia).

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semisólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

30

35

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o parte de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados, para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por pulverización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución esterilizada por filtración previamente del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede producirse incluyendo, en la composición, un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

40

45

50

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente invención pueden administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/el modo de administración preferido es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen en general por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

55

60

65

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, formarse por compresión en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta de sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden administrarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por una administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención se co-formula con y/o co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de RGM A es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-RGM A o parte de anticuerpo de la invención puede co-formularse y/o co-administrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen con otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen con citocinas o que se unen con moléculas de superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Dichas terapias de combinación pueden utilizar provechosamente dosificaciones menores de las de agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo para RGM A o fragmento del mismo está unido con un vehículo de extensión de semivida conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen pero, sin limitación, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Estados Unidos N° de Serie 09/428.082 y Solicitud de PCT publicada N° WO 99/25044, que se incorporan por la presente por referencia para cualquier fin.

En una realización específica, se administran secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención para tratar, prevenir, controlar o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Se describen métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Se desvela una discreción detallada de diversos métodos de terapia génica en el documento US 20050042664 A1 que se incorpora en el presente documento por referencia.

La RGM A desempeña un papel crítico en la patología asociada con una diversidad de enfermedades como se ha definido anteriormente en el presente documento. Se ha descrito que las proteínas RGM A y RGM están reguladas positivamente en sitios de lesión en seres humanos que padecen lesión cerebral traumática (Schwab *et al.*, *Arch. Neurol.* 62: 1561-8, 2005a) en áreas de penumbra infartada y central del cerebro humano dañado por ictus (Schwab *et al.*, *Arch. Neurol.* 62: 1561-8, 2005a); en la sustancia negra de pacientes que padecen enfermedad de Parkinson (Bossers *et al.*, *Brain Pathology* vol. 19: 91-107, 2008). Por lo tanto los anticuerpos de RGM A son agentes adecuados para terapia combinatoria de ictus cerebral, lesión cerebral traumática, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso humano. En pacientes con ictus el tratamiento actual en el intervalo de las tres primeras horas consiste en el suministro de activador de plasminógeno tisular para lisis de coágulos sanguíneos (Liang *et al.* *Arch. Neurol.* 65: 1429 -33, 2008) y dicho tratamiento podría en principio combinarse con un suministro de anticuerpo de RGM A que ofrece una enfoque de tratamiento diferente y una ventana terapéutica bastante más extendida. En enfermedad de Alzheimer, la combinación farmacológica con anticuerpos de RGM A es posible con los potenciadores de cognición aprobados, Donepezilo, Memantina y dicho enfoque podría ralentizar significativamente la neuropatología progresiva. El suministro intranasal de insulina tiene efectos positivos en la atención y la memoria (Hanson y Frey, *BMC Neurosci.* 9: S5, 2008) y es una posible vía de administración para anticuerpos de RGM A evitando de este modo la barrera hematoencefálica. En pacientes con enfermedad de Parkinson (PD), el tratamiento actual se basa principalmente en agentes dopaminérgicos como levodopa, un profármaco de dopamina (Khor y Hsu, *Curr. Clin. Pharmacol.* 2: 234 -43, 2007), ropinirol, un agonista de dopamina no ergolínic (Jost *et al.* *J. Neurol.* 255 Supl. 5: 60 -63, 2008), los inhibidores de monoamina oxidasa B Rasagilina y Selegilina (Elmer y Bertoni, *Expert Opin. Pharmacother.* 9: 2759 -72, 2008). A pesar de sus efectos beneficiosos en PD temprana y leve ninguno de estos fármacos es capaz de prevenir la degeneración progresiva de la sustancia negra y las áreas cerebrales subcortical y cortical asociadas y una terapia de combinación con anticuerpos de RGM A estimulantes de la regeneración podría por lo tanto ralentizar el proceso de enfermedad.

Cualquier agente neuroprotector, sea un antioxidante, un eliminador de radicales, un fármaco anti-compulsivo como Fenitoína o el fármaco de la anemia Eritropoyetina es adecuado para una terapia combinatoria con anticuerpos de RGM A pro-regenerativos extendiendo de este modo la ventana de tratamiento terapéutico habitualmente muy corta de los neuroprotectores.

5 Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden usarse para tratar a seres humanos que padecen dichas enfermedades.

10 Debería entenderse que los anticuerpos de la invención o parte de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que se trata por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que transmite un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente, que efectúa la viscosidad de la composición.

15 Debería entenderse adicionalmente que las combinaciones que van a incluirse dentro de la presente invención son las combinaciones útiles para su fin pretendido. Los agentes expuestos posteriormente son ilustrativos para fines y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones, que son partes de la presente invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas posteriores. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función pretendida.

25 Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los que un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención puede combinarse incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- β 1 a (AVONEX; Biogen); interferón- β 1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos para o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o su ligando. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas pro-inflamatorias tales como TNF α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasa), e inhibidores de enzima convertora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertora de angiotensina, receptores de citocina soluble y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

45 Los ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple en los que el anticuerpo o parte de unión antígeno del mismo puede combinarse incluyen interferón- β , por ejemplo, IFN β 1a e IFN β 1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF y anticuerpos para ligando CD40 y CD80.

50 Los anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos, también pueden combinarse con agentes tales como, alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliprodeno, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-immunocina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimiocina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista cannabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo anti-receptor de IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas de interferón gamma, agonistas de IL-4.

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte del anticuerpo puede determinarse por un experto en la materia y puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto

65

tóxico o perjudicial del anticuerpo, o parte del anticuerpo, se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, ya que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio más temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse una única embolada, puede administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y aumentar la uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo que se ha calculado que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular para conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, más preferentemente 1-10 mg/kg. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección para aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son ejemplares solamente y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Resultará fácilmente evidente para los expertos en la materia que otras modificaciones adecuadas y adaptaciones de los métodos de la invención descritos en el presente documento son obvias y pueden realizarse usando equivalentes adecuados sin alejarse del alcance de la invención o las realizaciones desveladas en el presente documento. Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, esta se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen para fines de ilustración solamente y no se pretende que sean limitantes de la invención.

Ejemplos:

Métodos

Los siguientes métodos describen en detalle los procedimientos experimentales usados en la sección de Ejemplos.

(i) Se recubrieron placas de ELISA de unión directa con hRGM A (R&D) a una concentración de 2 µg/ml en tampón de Carbonato. Los pocillos se bloquearon después con solución de Bloqueo al 2% (Bio-Rad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos biotinilados se diluyeron en serie con un factor de dilución 1:5 en BSA 0,1%/PBS a lo largo de la placa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El reactivo de detección fue una dilución 1:10.000 de estreptavidina-HRP en BSA 0,1% /PBS. La detección se realizó con un reactivo de TMB, que se detuvo con H₂SO₄ 2N y se leyó la DO a 450 nM.

(ii) Análisis de FACS. Se sometieron transfectantes estables de células HEK293 que sobreexpresaban hRGM A o células BAF3 que sobreexpresaban RGM A de rata a tinción con MAB 5F9 u 8D1 no marcados durante más de 15 minutos a 4 °C en tampón de BSA 0,1%/PBS. Se llevó a cabo la detección con un anticuerpo PE de ratón anti-IgG de rata.

(iii) Ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar MAB 5F9 en ensayos de unión de hRGM A-neogenina.

Se recubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 h a 37 °C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína Neogenina humana marcada con His (concentración de solución de reserva: 30 µg/ml). Después de la incubación, la Neogenina no unida se retiró en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 0,02%. El bloqueo de las placas recubiertas con Neogenina se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de una solución de bloqueo de albúmina de suero Bovino 3% (BSA), PBS, Tween 20 (0,02%). Después de incubación durante 1 h a 37 °C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos de RGM A o proteína de longitud completa, conjugados con un marcador fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con Neogenina se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 h a 37 °C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-fc humano marcado con Biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contiene BSA 0,6%, Tween 20 0,02%), Jackson ImmunoResearch nº de catálogo: 709-065-149, durante 1 h a 37 °C. El anticuerpo no unido se retiró por 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc

5 marcado con biotina, se añadió un complejo que consistía en Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, nº cat. 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA 0,6%, Tween 20 0,02%, seguido de incubación a 37 °C durante 1 h. Se retiró el complejo de Peroxidasa no unido en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%)) antes de añadir el sustrato de Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce nº 34021). La reacción del sustrato se detuvo 1 – 30 min después de su adición a los pocillos por H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(iv) Ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar MAB 5F9 en ensayos de unión de hRGM A - BMP-4

10 Las placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) se recubrieron durante 1 h a 37 °C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de proteína BMP-4 humana recombinante (R&D Systems, nº 314-BP, nº Lote BEM316061). Después de la incubación, la BMP-4 no unida se retiró en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 0,02%. Se realizó bloqueo de las placas recubiertas por BMP-4 añadiendo 200 µl por pocillo de una solución de bloqueo de albúmina de suero Bovino 3% (BSA), PBS, Tween 20 (0,02%). Después de incubación durante 1 h a 37 °C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos de RGM A o proteína de longitud completa, conjugados con un marcador de fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con BMP-4 se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 h a 37 °C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-fc humano marcado con Biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contenía BSA 0,06%, Tween 20 0,02%), Jackson ImmunoResearch nº de catálogo: 709-065-149, durante 1 h a 37 °C. Se retiró el anticuerpo no unido por 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con Biotina, se añadió un complejo que consistía en Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, nº cat. 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA 0,06%, Tween 20 0,02%, seguido de incubación a 37 °C durante 1 h. Se retiró el complejo de Peroxidasa no unido en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%)), antes de añadir el sustrato de Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce nº 34021). La reacción de sustrato se detuvo 1 – 30 min después de su adición a los pocillos por H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(v) Ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar MAB 5F9 en ensayos de unión de hRGM A - BMP-2

30 Se recubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 h a 37 °C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de proteína BMP-2 humana recombinante (R&D Systems, nº 355-BM, nº Lote MSA04). Después de la incubación, se retiró BMP-2 no unida en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 0,02%. Se realizó el bloqueo de las placas recubiertas por BMP-2 añadiendo 200 µl por pocillo de una solución de bloqueo de albúmina de suero Bovino 3% (BSA), PBS, Tween 20 (0,02%). Después de incubación durante 1 h a 37 °C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos de RGM A o proteína de longitud completa, conjugados con un marcador fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con BMP-2 se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 h a 37 °C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-fc humano marcado con Biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contiene BSA 0,06%, Tween 20 0,02%), Jackson ImmunoResearch nº de catálogo: 709-0651149, durante 1 h a 37 °C. El anticuerpo no unido se retiró por 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con Biotina, se añadió un complejo que consistía en Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, nº cat. 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA 0,06%, Tween 20 0,02%, seguido de incubación a 37 °C durante 1 h. Se retiró el complejo de Peroxidasa no unido en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%)), antes de añadir el sustrato de Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce nº 34021). La reacción de sustrato se detuvo 1 – 30 min después de su adición a los pocillos por H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(vi) Cultivo celular de Ntera-2

50 Se obtuvieron células Ntera-2 humanas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DMSZ, Branschweig). Se descongelaron reservas congeladas de células Ntera-2 indiferenciadas en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; JRH Bioscience, Kansas, Estados Unidos) y suero de caballo al 5% (HS; Sigma, Alemania). Las células se cultivaron en matraces de cultivo (Greiner, Alemania) hasta que alcanzaron una confluencia del 80%.

55 Para la diferenciación neuronal, se sembraron células Ntera-2 a una densidad de 2,5 x 10⁶ células/175 cm² en medio de diferenciación (medio DMEM que contenía FBS 10%, HS 5%, penicilina-estreptomina 1%, ácido retinoico 10 µM). Las células se diferenciaron durante 3 semanas y el medio se cambió dos veces por semana.

60 Después de la diferenciación, las células se separaron con tripsina-EDTA y se dividieron a una relación de 1:6. 48 horas después las células neuronales se separaron por golpes suaves de las células subyacentes. Las células desalojadas se transfirieron para agregación en nuevo medio a nuevos matraces de cultivo de agitación (Corning, Estados Unidos). Se permitió que las células Ntera-2 diferenciadas se agregaran en condiciones de agitación horizontal suave a 37 °C durante 24 horas en medio Neurobasal (Gibco) complementado con B27 (Gibco), glutamina (Gibco) y penicilina-estreptomina. Se sembraron agregados de Ntera-2 a una densidad de aproximadamente 20-30 agregados por cada cubreobjetos en placas de 24 pocillos. Los cubreobjetos prerrecubiertos con polilisina se recubrieron con laminina (20 µg/ml, Sigma) y con el fragmento de RGM A humano acoplado a fc recombinante N° 786 (aminoácidos 47 - 168) a una concentración de 10 µg/ml. Después

de sembrar, los cultivos se trataron con el MAB 5F9, se añadieron a tres concentraciones diferentes (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) al medio de cultivo y se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 37 °C en medio Neurobasal. Los agregados se fijaron después en paraformaldehído al 4% (2 horas, a temperatura ambiente) y se permeabilizaron mediante la adición de Tritón X-100 0,1% en PBS (20 minutos a temperatura ambiente). Para tinción fluorescente se bloquearon cultivos con PBS que contenía BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de bloquear las células Ntera se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra el isotipo 3 de β tubulina (clon SDL3D10, Sigma N° T8660) durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se retiró por 3 etapas de lavado diferentes (5-15 minutos cada una) y las células Ntera se incubaron con un anticuerpo anti ratón de Burro conjugado con Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Lote 62597), diluido 1:350 veces en PBS/BSA 0,5% y Bisbenzimidazol 0,5 µg/ml. Después de 1 hora de incubación, los cultivos se lavaron 3 veces para retirar el anticuerpo secundario no unido. Para microscopía de fluorescencia, se incluyeron cubreobjetos en Fluoromount G (Southern Biotech, Eching).

Se adquirieron imágenes de agregados de Ntera 2 usando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 y la extensión de los cultivos se analizó automáticamente usando un sistema de adquisición y análisis de imágenes interno. Se realizó análisis automático de la extensión con Image Pro Plus 4.5 y el análisis estadístico de los datos se realizó con Graph Pad Prism 4. La extensión se normalizó para cultivos de control que habían crecido en ausencia del fragmento de RGM A humana N° 786.

(vii) Cultivo de SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) son células de neuroblastoma humano derivadas de un tumor cerebral metastásico. Estas células se cultivaron en un medio que consistía en Solución Salina Equilibrada de Earle al 50% (Invitrogen Life Technologies, Cat. N° 24010-043) y Mezcla de Nutrientes F12 (Ham) al 50% + GlutaMAX-1 (Invitrogen Life Technologies, Cat. N° 31765-027). Este medio se complementa adicionalmente con suero de ternero fetal al 10% inactivado por calor (FCS, JRH Biosciences, Kansas Cat. N° 12107-1000M), NEAA (solución de Aminoácidos no esenciales de MEM (Sigma-Aldrich Cat. N° M1745)) 1%, y Penicilina 1% (10.000 U/ml)/Estreptomycin (10.000 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Cat. N° 15140-122). Para estimular la diferenciación neuronal y el crecimiento de procesos neuronales, se cultivaron células SH-SY5Y en medio complementado con ácido retinoico 10 µM (RA, Sigma-Aldrich Cat. N° R2625-050MG) durante varios días. Se cultivaron células SH-SY5Y diferenciadas en matraces de cultivo tisular y se retiraron por tripsinación cuidadosa y se sembraron en portaobjetos de vidrio recubiertos con un patrón rayado de proteína RGM A o fragmento de ella y Colágeno I.

(viii) Preparación de cubreobjetos de vidrio en tiras

La versión modificada del ensayo de tiras en cubreobjetos de vidrio se realizó de una manera ligeramente distinta a la descrita previamente (Knoell *et al.* Nature Protocols 2: 1216 - 1224, 2007) y se resume a continuación.

Se presionaron matrices de silicio estériles para producción de tiras consistentes en proteínas purificadas sobre la superficie de una placa de Petri con la cara rugosa de la matriz apuntando hacia arriba. Los cubreobjetos limpios, lavados con etanol, se pusieron sobre la matriz y se marcaron las esquinas de la matriz con un bolígrafo en la parte trasera del cubreobjetos. Se dio la vuelta cuidadosamente a la matriz que portaba el cubreobjetos con el cubreobjetos hacia el fondo de la placa de Petri. RGM A inhibidor de longitud completa conjugado con fc o fragmentos fc o RGM A humano recombinante (R&D Systems Cat. N° 2459 RM) del mismo se mezclaron con 10 µl de un anticuerpo anti ratón marcado con FITC (IgG de cabra específico de Fab anti ratón, Sigma-Aldrich Cat. N° F-4018) para visualizar las tiras de RGM A. Usando una jeringa Hamilton, se inyectan cuidadosamente 50 µl de la solución de anticuerpo de RGM A - FITC a través del canal de entrada. El líquido en exceso dejó la matriz a través del canal de salida y se retiran con un pañuelo de papel. Después de incubación del cubreobjetos-matriz a 37 °C durante 2 horas, se retiró por lavado la primera solución de recubrimiento (que contenía RGM A) con 100 µl de PBS. En la siguiente etapa, el cubreobjetos con las tiras de RGM A se transfirió a una placa de 24 pocillos, se recubrió con 500 µl de Colágeno I (Colágeno I de cola de rata, Becton Dickinson Biosciences Cat. N° 354236) para llenar los espacios vacíos entre las tiras de RGM A y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Al final se produjo un patrón de tiras alternantes de RGM A y Colágeno I en el cubreobjetos. Después de incubación, se retiró por lavado Colágeno I no unido por tres etapas de lavado separadas con PBS y se sembraron células SH-SY5Y diferenciadas en los cubreobjetos. La incubación de las células SH-SY5Y en el sustrato en patrón continuó a 37 °C durante 20-24 horas en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra RGM A humana.

Para análisis de inmunofluorescencia las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C y se permeabilizaron por incubación con PBS que contenía Tritón X-100 0,1% durante 10 - 20 minutos a temperatura ambiente. Después de bloquear con BSA al 3% durante 60 minutos, las células se incubaron con el anticuerpo primario (clon de isotipo 3 monoclonal anti β-tubulina SDL 3D10, Sigma-Aldrich Cat. N° T8660) durante 2 horas a temperatura ambiente y después de varias etapas de lavado con el anticuerpo secundario (Cy-3 de burro anti ratón JacksonImmuno Research Lote:62597), se diluyeron en PBS con BSA 0,1% durante 1 hora. Los núcleos se contratiñeron usando Bisbenzimidazol H33258 (Riedel-De-Haen, Cat. N° A-0207). Las células se incluyeron finalmente en Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.: Cat. N° 010001). Las células se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Axioplan2 (Zeiss).

(ix) Construcción y expresión de anticuerpos anti RGMA recombinantes. El ADN que codifica los fragmentos de ADNc de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales de rata anti RGMA humana 5F9 y 8D1 se clonó en un vector de expresión pHybE que contenía la región constante de IgG1 humana, que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de región bisagra, por recombinación homóloga en bacterias. Estas

mutaciones son un cambio de leucina a alanina en las posiciones 234 y 235 (numeración de EU, Lund *et al.*, 1991, J. Immunol., 147: 2657). La región variable de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se clonó en el vector pHybE que contenía una región constante kappa humana. Los vectores pHyb-E ejemplares incluyen el pHybE-hCk y pHybE-hCg1,z,no a (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 61/021.282). Se expresaron transitoriamente anticuerpos de longitud completa en células 293E por cotransfección de ADNc de cadena pesada y ligera quimérica ligados en el plásmido de expresión pHybE. Se purificaron sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo recombinante por cromatografía de Proteína A Sepharose y se eluyó el anticuerpo unido mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS. Los anticuerpos monoclonales purificados anti RGMA humano se ensayaron después con respecto a su capacidad para unirse con RGMA por ELISA como se describe en el Ejemplo 1 y ELISA de competición como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 1: generación de anticuerpos monoclonales anti RGMA humana

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales de rata anti RGMA humana de la siguiente manera:

Ejemplo 1A: inmunización de ratas con antígeno de RGMA humano

Se inyectaron veinticinco microgramos de RGMA humana purificada recombinante (R&D Systems Cat N° 2459-RM lote MRH02511A) mezclada con adyuvante completo de Freund (Sigma) por vía subcutánea en cuatro ratas Harlan Sprague Dawley de 6-8 semanas de edad el día 1. Los días 21, 42 y 63, se inyectaron veinticinco microgramos de RGMA humana purificada recombinante mezclada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) por vía subcutánea en las mismas 4 ratas Harlan Sprague Dawley. El día 144, o día 165 se inyectó a las ratas por vía intravenosa 10 µg de RGMA humana purificada recombinante.

Ejemplo 1 B: generación de hibridoma

Se fusionaron esplenocitos obtenidos de las ratas inmunizadas descritas en el Ejemplo 1.2.A con células SP2/O- a una relación de 2:1 de acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256: 495 para generar hibridomas. Se sembraron productos de fusión en medios de selección que contenían azaserina e hipoxantina en placas de 96 pocillos a una densidad de 1,5 x 10⁵ células del bazo por pocillo. De siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridoma macroscópicas. Se ensayó el sobrenadante de cada pocillo que contenía colonias de hibridoma por ELISA directo (véase Ejemplo 2) con respecto a la presencia de anticuerpo para RGMA humana. Las líneas celulares positivas para ELISA se ensayaron en FACS frente a células HEK293 transfectadas de forma estable que expresaban RGMA humana y/o de rata. Estas líneas celulares de hibridoma de rata se ensayaron posteriormente en ELISA Directo con respecto a reactividad cruzada con RGMA de rata, y unión de ELISA con proteína de fusión de HuRGMA 47-168.

Tabla 7: unión de anticuerpos monoclonales de rata anti RGMA

| Nombre | ELISA Directo rHuRGMA | FACS HEK293-rhRGMA | ELISA Directo rRatRGMA | ELISA Directo hRGMA 47-168/HulgGfC |
|----------|-----------------------|--------------------|------------------------|------------------------------------|
| ML68-8D1 | Sí | Sí | No | Sí |
| ML69-5F9 | Sí | Sí | Sí | Sí |

Ejemplo 2. Unión de ELISA directo de mAB 5F9 y 8D1.

Como se muestra en la Figura 1A, los MAB 5F9 y 8D1 se unen con hRGM A con títulos similares, como se ha descrito en la sección anterior (i). También se ha mostrado que el MAB 5F9 se une con ratRGM A en ELISA, mientras que 8D1 no es capaz de unirse con ratRGM A (datos no mostrados). La Figura 1B muestra que los MAB 5F9 y 8D1 se unen con células HEK293 que sobreexpresan hRGM A en FACS. La Figura 1C muestra que 5F9 pero no 8D1 es capaz de unirse con células BAF3 que sobreexpresan ratRGM A en FACS. Se llevó a cabo FACS como se ha descrito en la sección (ii).

Se usaron ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar la unión del MAB 5F9 en ensayos de unión competitiva de hRGM A-neogenina. Se prepararon placas de ELISA y se usaron como se describe en la sección (iii) de la presente solicitud. Se añadió hRGM A a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9 durante 1 hora a 37 °C. Se usó MAB 5F9 a las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,08 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti fc marcado con Biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se muestra en la Figura 2, las tres concentraciones de anticuerpo mayores, inhibieron de forma dependiente de la dosis la unión de RGM A humana de longitud completa con Neogenina.

Se usaron ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar también MAB 5F9 en ensayos de unión competitiva de hRGM A-BMP-4. Se prepararon placas de ELISA y se usaron como se describe en la sección (iv) de la presente

solicitud. Se añadió hRGM A a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9 durante 1 hora a 37 °C. Se usó MAB 5F9 a las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,08 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti fc marcado con Biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se muestra en la Figura 3, las cuatro concentraciones de anticuerpo mayores, inhibieron de forma dependiente de la dosis la unión de RGM A humana de longitud completa con BMP-4.

También se usaron ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar la inhibición de la unión de MAB 5F9 del fragmento 0 (47 - 168) de hRGM A con BMP-4. Se recubrieron placas de ELISA durante 1 hora a 37 °C con una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-4 humana recombinante. Se añadió cadena ligera de hRGM A (fragmento 0, 47-168) a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9 durante 1 hora a 37 °C. Se usó MAB 5F9 a las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,08 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti fc marcado con Biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. La Figura 4 representa las concentraciones de anticuerpo de 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml y 0,32 µg/ml que inhiben de forma dependiente de la dosis la unión de la cadena ligera de RGM A humana con BMP-4.

También se usaron ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar la unión de MAB 5F9 en ensayos de unión competitiva de hRGM A - BMP-2. Se prepararon placas de ELISA y se usaron como se describe en la sección (v) de la presente solicitud. Se añadió hRGM A de longitud completa a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9 durante 1 hora a 37 °C. Se usó MAB 5F9 a las siguientes concentraciones: 5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti fc marcado con Biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. La Figura 5 representa concentraciones de anticuerpo de 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, que inhibían la unión de RGM A humana de longitud completa con BMP-2.

También se usaron ensayos de ELISA de fase sólida para evaluar los MAB 5F9 y 8D1 en ensayos de unión de hRGM A - neogenina, hRGM A -BMP-2 y hRGM A - BMP-4. (Figura 9) Como se describe, las placas de ELISA se recubrieron durante 1 hora a 37 °C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína Neogenina humana marcada con His o con Bmp-2 o BMP-4 2,5 µg/ml. Se añadió hRGM A conjugado con fc de longitud completa a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos durante 1 hora a 37 °C. Se usaron los MAB 5F9 y 8D1 a las siguientes concentraciones: 5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,08 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti fc marcado con Biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se muestra en la Figura 9, el anticuerpo monoclonal de rata 8D1 inhibe o reduce la unión de RGM A humana con BMP-2 y con BMP-4 pero no es capaz de inhibir su unión con Neogenina.

Ejemplo 3. Actividad de mAb 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas Ntera humanas diferenciadas

Se obtuvieron células Ntera y se cultivaron como se describe en la sección del Método (vi) de la presente solicitud. El mAb 5F9 neutralizó la actividad inhibitoria de extensión de neuritas de la potente cadena ligera conjugada con fc (aminoácidos 47 - 168) de la proteína RGM A humana en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de diferentes neuronas Ntera humanas diferenciadas. Como se muestra en la Figura 6, en ausencia de una proteína RGM A inhibitoria o fragmento y en presencia de la laminina de sustrato estimulante de la extensión, los agregados de Ntera neuronales muestran una red extensiva y densa de neuritas en extensión (A). También se muestra en la Figura 6 que la presencia de la cadena ligera de hRGM A, reduce drásticamente el número, la densidad y longitud de neuritas Ntera, lo que demuestra la actividad inhibitoria potente del fragmento de hRGM A. Las pocas neuritas que dejan el agregado son cortas y empaquetadas estrechamente (B). Las partes C-E de la Figura 6 muestran que concentraciones crecientes del MAB 5F9, añadido a los cultivos de forma dependiente de dosis neutralizaron o desreprimieron la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas del fragmento de cadena ligera de hRGM A. Con concentraciones crecientes de MAB, se restaura completamente la extensión de agregados neuronales de Ntera, a pesar de la presencia del inhibidor de RGM A (C: MAB 5F9 0,1 µg/ml; D: MAB 5F9 1 µg/ml; E: MAB 5F9 10 µg/ml).

Se realizó análisis cuantitativo de la actividad neutralizante de MAB 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de Ntera humanos para ensayar el fragmento inhibitorio de cadena ligera conjugada con fc potente (aminoácidos 47 - 168) de la proteína RGM A humana. La extensión de los cultivos se analizó automáticamente tiñendo agregados con bis-bencimida y fotografiando posteriormente. La tinción solamente marcó el agregado, no las neuritas en extensión. Estas se tiñeron, sin embargo, con un anticuerpo para B3-tubulina y un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo. La extensión de neuritas se determinó automáticamente calculando el índice de extensión de neuritas, un índice determinado restando el área de los cuerpos celulares del área teñida de B3-tubulina del agregado y sus procesos. Este factor se dividió después por el área de los cuerpos celulares como se describe en Lingor *et al.* J. Neurochem. 103: 181 - 189, 2007. La Figura 7 muestra que el MAB 5F9 de forma

dependiente de dosis (0.1-10,0 µg) neutralizó la actividad inhibitoria de la extensión de un fragmento inhibitorio de hRGM A potente, conjugado con fc (fragmento 0, 47 - 168; 10 µg) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de Ntera humanos.

5 **Ejemplo 4. Actividad del mAb 5F9 en tiras de hRGM A/colágeno I.**

Se cultivaron células SH-SY5Y y se usaron como se describe en la sección (vii) de la presente solicitud. Se prepararon cubreobjetos de vidrio en tiras con RGM A y Colágeno I como se describe en la sección (viii) de la presente solicitud. Se produjo una alfombra con tiras alternas de hRGM A/Colágeno I y Colágeno I para los experimentos de acuerdo con un protocolo descrito en la bibliografía (Knoell *et al.* Nature Protocols 2: 1216 - 1224, 2007). En ausencia del 5F9 MAB (A), las células SH-SY5Y neuronales muestran una clara preferencia por la tira de Colágeno I prefiriendo más del 90% de las células tiras de Colágeno I frente a tiras de hRGM A. Con concentraciones crecientes de MAB 5F9 las células SH-SY5Y neuronales prefieren tiras de hRGM A frente a tiras de Colágeno I (B-E). A la mayor concentración de MAB usada (E), las neuronas SH-SY5Y muestran una fuerte preferencia por tiras de hRGM A en comparación con las tiras de Colágeno I (véase Figura 8). Esto puede interpretarse como una característica única del MAB 5F9 ya que transformó la naturaleza inhibitoria de RGM A en una actividad atractiva. En presencia de concentraciones crecientes de 5F9, las células neuronales prefieren migrar y crecer en un sustrato de RGM A, y no en un sustrato permisivo como Colágeno I. Dicha característica única no se ha descrito nunca anteriormente para un anticuerpo monoclonal.

20 **Ejemplo 5: Construcción de anticuerpos con injertos de CDR**

Aplicando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, las secuencias de CDR de cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 (véase Tabla 5 anterior) se injertan en diferentes secuencias aceptoras de cadena pesada y ligera humanas. Basándose en los alineamientos de secuencias VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 de la presente invención se seleccionan las siguientes secuencias humanas conocidas:

- 30 a) VH3-48, VH3-33 y VH3-23 así como las secuencias de unión hJH3, hJH4 y hJH6 para construir secuencias aceptoras de cadena pesada (de acuerdo con la Tabla 3 anterior);
 b) A17 y A18 así como hJK2 para construir secuencias aceptoras de cadena ligera (de acuerdo con la Tabla 4 anterior).

Injertando las CDR VH y VL correspondientes de 5F9 en dichas secuencias aceptoras se prepararon las siguientes secuencias de VH y VL modificadas, humanizadas, con injertos de CDR (véase también Tabla 6, anterior): VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, VH 5F9.3-GL, VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, VH 5F9.6-GL, VH 5F9.7-GL y VH 5F9.8-GL; VL 5F9.1-GL, VL 5F9.2-GL, y VL 5F9.3-GL.

35 **Ejemplo 6: construcción de retromutaciones de marco conservado en anticuerpos con injertos de CDR**

40 Para generar retromutaciones de marco conservado de anticuerpo humanizado se introdujeron mutaciones en las secuencias de anticuerpo con injertos de CDR como se ha preparado de acuerdo con el Ejemplo 5, por síntesis *de novo* del dominio variable y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones se construyen para cada uno de los injertos de CDR de la siguiente manera.

45 Para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de VHNL de la siguiente manera: V37→I, V48→I, S49→G y/o R98→K

50 Para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de VHNL de la siguiente manera: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

Para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de VHNL de la siguiente manera: V37→I, V48→I; S49→G.

55 Las mutaciones adicionales incluyen las siguientes:

- para cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL: D88→A,
 para cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL: Q1→E y
 para cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL: L5→V.
 60 Para cadena ligera VL 5F9.1-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de VH/VL de la siguiente manera: I2→V, M4→L, Y41→F.
 Para cadena ligera VL 5F9.2-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de VHNL de la siguiente manera: M4→L, R51→L.
 Para cadena ligera VL 5F9.3-GL se retromutaron uno o más de los siguientes restos de Vernier e interfaz de
 65 VHNL de la siguiente manera: M4→L, Y41→F.

EJEMPLO 7: CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS ANTI RGMA HUMANIZADOS RECOMBINANTES

Se co-transfectaron vectores de expresión pHybE que albergaban cadenas pesadas y ligeras que contenían retromutaciones de marco conservado en células 293-6E para producir de forma transitoria anticuerpos humanizados de longitud completa como se han descrito en la sección IX anterior. Se introdujeron mutaciones en las secuencias de anticuerpo con injertos de CDR como se prepara de acuerdo con el Ejemplo 5, por síntesis *de novo* del dominio variable y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. La secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se desvelan en la Tabla 8.

Específicamente, para las cadenas pesadas:

VH 5F9.1, VH 5F9.5 y VH 5F9.9 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E.

VH 5F9.2, VH 5F9.6, VH 5F9.10, VH 5F9.19, VH 5F9.20, VH 5F9.21 y VH 5F9.22 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E y las siguientes retromutaciones de restos de Vernier e interfaz de VHNL: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

VH 5F9.3, VH 5F9.7 y VH 5F9.11 contienen VH 5F9.7-GL con una mutación L5→V. VH 5F9.4, VH 5F9.8, VH 5F9.12, VH 5F9.23, VH 5F9.24, VH 5F9.25 y VH 5F9.26 contienen VH 5F9.7-GL con una mutación L5→V y las siguientes retromutaciones de restos de Vernier e interfaz de VHNL: V37→I, V48→I, S49→G.

Para las cadenas ligeras:

VL 5F9.1, VL 5F9.2, VL 5F9.3 y VL 5F9.4 son idénticos a VL 5F9.1-GL.

VL 5F9.5, VL 5F9.6, VL 5F9.7 y VL 5F9.8 son idénticos a VL 5F9.2-GL.

VL 5F9.9, VL 5F9.10, VL 5F9.11 y VL 5F9.12 son idénticos a VL 5F9.3-GL.

VL 5F9.19 y VL 5F9.23 contienen VL 5F9.2-GL con las siguientes retromutaciones de restos de Vernier e interfaz de VH/VL: M4→L, R51→L. VL 5F9.20 y VL 5F9.24 contienen VL 5F9.2-GL con las siguientes retromutación de resto de Vernier e interfaz de VH/VL: M4→L.

VL 5F9.21 y VL 5F9.25 contienen VL 5F9.3-GL con las siguientes retromutaciones de restos de Vernier e interfaz de VH/VL: M4→L, Y41→F. VL 5F9.22 y VL 5F9.26 contienen VL 5F9.3-GL con las siguientes retromutaciones de restos de Vernier e interfaz de VHNL: M4→L.

35 TABLA 8: Expresión de anticuerpos humanizados

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|--|
| | | 123456789012345678901234567890 |
| 47 | VH h5F9.1 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 44 | VL h5F9.1 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.2 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 44 | VL h5F9.2 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGOGTKLEIKR |

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|--|
| 49 | VH h5F9.3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 44 | VL h5F9.3 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 50 | VH h5F9.4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 44 | VL h5F9.4 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 47 | VH h5F9.5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 45 | VL h5F9.5 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.6 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 45 | VL h5F9.6 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 49 | VH h5F9.7 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 45 | VL h5F9.7 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLTFGOGTKLEIKR |

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|--|
| 50 | VH h5F9.8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 45 | VL h5F9.8 | DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQORPGQSPRRLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FOATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 47 | VH h5F9.9 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 46 | VL h5F9.9 | DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQORPGQSPRRLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FOATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.10 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVAMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCARG GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 46 | VL h5F9.10 | DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPOLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FOATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 49 | VH h5F9.11 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 46 | VLH h5F9.11 | DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPOLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FOATHDPLTFGOGTKLEIKR |
| 50 | VH h5F9.12 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWVRQAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGOGTMVTVSS |
| 46 | VL h5F9.12 | DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPOLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FOATHDPLTFGOGTKLEIKR |

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|--|
| 48 | VH h5F9.19 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGQGMVTVSS |
| 51 | VL h5F9.19 | DVVMTQSP LSLPVT LGQPAS I SCRSSQSLE YSDGYTFLEWY LQKPGQSPQLLIYEVS NR F SGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.20 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGQGMVTVSS |
| 52 | VL h5F9.20 | DVVL TQSP LSLPVT LGQPAS I SCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQORPGQSPRLLIYEVS NR F SGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.21 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGQGMVTVSS |
| 53 | VL h5F9.21 | DVVL TQSP LSLPVT LGQPAS I SCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQORPGQSPRLLIYEVS NR F SGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 48 | VH h5F9.22 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGQGMVTVSS |
| 54 | VL h5F9.22 | DVVL TQSP LSLPVT LGQPAS I SCRSSQSLE YSDGYTFLEWF LQKPGQSPQLLIYEVS NR F SGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLTFGQGTKLEIKR |
| 50 | VH h5F9.23 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDYWGQGMVTVSS |
| 51 | VL h5F9.23 | DVVL TQSP LSLPVT LGQPAS I SCRSSQSLE YSDGYTFLEWY LQKPGQSPQLLIYEVS NR F SGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLTFGQGTKLEIKR |

| SEC ID N° | Región proteica | Secuencia |
|-----------|-----------------|--|
| 50 | VH h5F9.24 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDY WGQGMVTVSS |
| 52 | VL h5F9.24 | DVVL TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGOGTKLEIKR |
| 50 | VH h5F9.25 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDY WGQGMVTVSS |
| 53 | VL h5F9.25 | DVVL TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGOGTKLEIKR |
| 50 | VH h5F9.26 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTTPDY WGQGMVTVSS |
| 54 | VL h5F9.26 | DVVL TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFLOKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGOGTKLEIKR |

Ejemplo 8: Caracterización de anticuerpos 5F9 humanizados usando ELISA de competición

5 Se recubrieron placas de ELISA (Costar 3369) durante una noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de hRGMA 0,25 µg/ml en tampón de carbonato sódico-bicarbonato 0,2 M, pH 9,4, se lavaron con Tampón de Lavado (PBS que contenía Tween 20 0,1%) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de leche en polvo sin grasa al 2% en PBS. Después de lavar con Tampón de Lavado, se añadió una mezcla de un anticuerpo 5F9 químico biotinilado (concentración final de 0,1 µg/ml) y de ensayo competidor no marcado comenzando a una concentración de 50 µg/ml y diluido en serie 5 veces) en 50 µl/pocillo de tampón de ELISA se añadió por duplicado. Después de incubar las placas durante 1 h a temperatura ambiente, y lavar con Tampón de Lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en tampón de ELISA. Después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente, y lavar con Tampón de Lavado, se realizó revelado del color añadiendo 100 µl/pocillo de Tampón TMB (Zymed). Después de incubar durante 15 min a temperatura ambiente, se detuvo el revelado del color añadiendo 50 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N. La absorbancia se leyó a 490 nm.

La Tabla 9 muestra los valores de CI₅₀ de anticuerpos 5F9 humanizados obtenidos usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

20 Tabla 9: Valores de CI₅₀ de anticuerpos 5F9 humanizados en ELISA competitivo

| Anticuerpo | CI ₅₀ (µg/ml) | Anticuerpo | CI ₅₀ (µg/ml) |
|------------|--------------------------|------------|--------------------------|
| h5F9.1 | >10 | h5F9.19 | N/D |
| h5F9.2 | >10 | h5F9.20 | >2,0 |
| h5F9.3 | >10 | h5F9.21 | 0,60 |
| h5F9.4 | >10 | h5F9.22 | >2,0 |
| h5F9.5 | >10 | h5F9.23 | 0,55 |
| h5F9.6 | >10 | h5F9.24 | 1,32 |

| Anticuerpo | CI50 (µg/ml) | Anticuerpo | CI50 (µg/ml) |
|------------|--------------|------------|--------------|
| h5F9.7 | >10 | h5F9.25 | 0,66 |
| h5F9.8 | >10 | h5F9.26 | >2,0 |
| h5F9.9 | >10 | | |
| h5F9.10 | >10 | | |
| h5F9.11 | >10 | | |
| h5F9.12 | >10 | | |

Ejemplo 9: Determinaciones de afinidad de anticuerpos quiméricos y humanizados usando tecnología BIACORE

- 5 El ensayo de BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de velocidad de asociación/disociación. La unión de anticuerpos con RGMA humana purificada recombinante se determinó por mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP de ejecución (HEPES 10 mM [pH 7,4] NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y tensoactivo P20 0,005%) a 25 ° C. Todos los productos químicos se obtuvieron de
- 10 Biacore® AB (Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 UR de anticuerpo policlonal específico de fragmento de cabra anti-IgG humano, (Fc_γ), (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato sódico 10 mM (pH 4,5) a través de una microplaca biosensora de uso de investigación CM5 usando un kit de acoplamiento de amina convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante y procedimientos a 25 µg/ml. Se bloquearon restos que no habían reaccionado en la superficie biosensora con etanolamina. Se usó superficie de
- 15 carboximetil dextrano modificada en celdas de flujo 2 y 4 como una superficie de reacción. Se usó carboximetil dextrano no modificado sin IgG de cabra anti-humano en celda de flujo 1 y 3 como la superficie de referencia. Se diluyeron anticuerpos purificados en solución salina tamponada con HEPES para captura por toda la superficie de reacción específica de IgG de cabra anti-humano. Los anticuerpos humanos para capturar como un ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción a un caudal de 5 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}) se determinaron con un caudal continuo de 25 µl/min. Las
- 20 constantes de velocidad se derivaron realizando mediciones de unión cinética a diez concentraciones de antígeno diferentes que variaban de 0,39 – 50 nM. Para análisis cinético, las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste global) con el uso de software Biaevaluation 4.0.1. La constante de disociación en equilibrio (unidad M) de la reacción entre anticuerpos humanizados y RGMA humana purificada recombinante se
- 25 calculó después a partir de las constantes de velocidad cinética por la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Tabla 9: Afinidad de anticuerpos monoclonales anti-RGMA quiméricos y humanizados

| Nombre | k_{on} (1/M*s) | k_{off} (1/s) | K_D (nM) |
|---------------|--------------------|-----------------------|------------|
| 5F9 quimérico | $7,65 \times 10^5$ | $2,36 \times 10^{-3}$ | 3,09 |
| h5F9.21 | $3,55 \times 10^5$ | $2,69 \times 10^{-3}$ | 7,59 |
| h5F9.23 | $5,07 \times 10^5$ | $2,21 \times 10^{-3}$ | 4,37 |
| h5F9.25 | $5,70 \times 10^5$ | $3,29 \times 10^{-3}$ | 5,78 |

- 30 **Ejemplo 10: Los anticuerpos 5F9 humanizados neutralizan la actividad quimiorrepulsiva de RGM A humana en un ensayo de quimiotaxis de SH-SY5Y neuronales.**

- El ensayo de quimiotaxis mide el comportamiento quimiotáctico de células en respuesta a factores difundibles que pueden ejercer actividades quimioatrayentes o quimiorrepulsivas. La RGM A se ha descrito como una proteína que
- 35 actúa en forma tanto unida a membrana (repulsión dependiente de contacto) como difundible, soluble (quimiorrepulsiva) y se ha evaluado por lo tanto en un ensayo de quimiotaxis de hRGM A. Para este objetivo se usaron células de neuroblastoma humano sensibles a RGM A, SH-SY5Y, que portaban el receptor de RGM Neogenina (Schaffar *et al.* J. Neurochemistry: 107: 418 - 431, 2008). Se cultivaron células SH-SY5Y en Solución Salina Equilibrada de Earle/Medio F12 (EBSS/F12) complementado con suero bovino fetal 10% y aminoácidos no
- 40 esenciales 1%. Para inducción de la extensión de neuritas se cultivaron células en medio complementado con ácido retinoico 10 µM (AR). 5-6 horas después, las células se tripsinizaron y se contaron para siembra en placas en Boyden Chambers de 24 pocillos (BD Falcon 351185, HTS Multiwell System). Se añadieron 500 µl de la suspensión celular (correspondientes a 1×10^5 células) al círculo interno de cada pocillo. Este círculo interno se separa del círculo externo mayor de cada pocillo por una membrana PET con un diámetro de poro de 8 µm. Se pipetearon 600 µl de
- 45 medio +/- RGM A +/- anticuerpos en el círculo externo y las células se cultivaron en el Multiwell Boyden Chambers durante una noche a 37 °C. Después de la incubación el medio se aspiró y se reemplazó por el fijador (paraformaldehído al 2%). La fijación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente y después de varias etapas de lavado con PBS se realizó permeabilización usando PBS que contenía Triton-X-100 0,1% (15 min, TA). Se realizó tinción de células incubándolas durante 1 hora en oscuridad en una solución de Alexa Fluor 488 Faloidina 1:100 (Invitrogen A12379) y Bisbenzimidaz (H332456) 1:100. Después de 2 etapas de lavado con PBS, los cultivos se
- 50 cargaron con PBS, se sellaron por parafilm y se almacenaron en la oscuridad para el análisis con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert).

En ausencia de hRGM A las células migran a través de los poros de membrana y pueden contarse después de fijación y tinción. Solamente se cuentan las células que se unieron con el fondo de la membrana, porque estas células habían migrado a través de la membrana PET. Las células en la parte superior de la membrana se retiraron cuidadosamente antes del procedimiento de fijación. Este ensayo de quimiotaxis demostró que la presencia de hRGM A reducía significativamente el número de células SH-SY5Y que migraban a través de la membrana en más del 80%. El anticuerpo monoclonal 5F9 de rata, el 5F9 quimérico humano-de rata y el 5F9 humanizado pero no uno monoclonal de rata de control de isotipo (p21) neutralizó parcial o completamente la actividad quimiorrepulsiva de hRGM A a 10 µg/ml, manifestado como mayores números de células hallados en el fondo de la membrana (Figura 10).

Ejemplo 11: 5F9 induce la regeneración de axones del nervio óptico dañados, contusionados, en un modelo de rata de lesión del nervio óptico.

El modelo de Contusión del Nervio Óptico (o Lesión del Nervio Óptico) proporciona un modelo animal para ensayar diversas sustancias que estimulan la regeneración de las fibras nerviosas ópticas y reducen la muerte celular masiva de células ganglionares retinianas.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley macho adultas y Wistar macho obtenidas de Charles River (D) Laboratories (Alemania). Los animales se mantienen en jaulas individuales en un ciclo de luz/oscuridad de 12 : 12 h con alimento y agua a voluntad. La contusión del nervio óptico se realiza siempre solamente en el ojo izquierdo por cirugía anterior mínima. Éste es un método mínimamente invasivo de lesión del nervio óptico y se desarrolló por los inventores, de acuerdo con métodos quirúrgicos visuales anteriores humanos. Antes y durante el procedimiento de operación se anestesia a los animales por anestesia de inhalación usando Sevoflurano (Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Alemania) y se fijan en la mesa de operaciones usando mordaza y cinta adhesiva para las extremidades. Una caída en la temperatura corporal se previene montando animales sobre una almohadilla térmica. Para cirugía de contusión anterior de nervio óptico de rata, el ojo izquierdo se libera cuidadosamente de ligamento y tejido conectivo. Como una primera etapa, se realiza un corte microquirúrgico (2-3 mm) del tejido adyacente en la esquina externa del ojo. Después el nervio óptico se expone usando un par de fórceps para mover al lateral del ojo músculos y la glándula lacrimal, evitándolos de este modo. En la siguiente etapa, las meninges se abrieron longitudinalmente usando microtijeras para exponer el nervio óptico.

Esto da como resultado una mayor movilidad del ojo y permite la rotación lateral del ojo y acceso a su nervio óptico izquierdo. El nervio óptico se lesiona aproximadamente 1-3 mm por detrás del ojo, usando un par de fórceps ajustados para proporcionar una presión máxima fija durante 20-30 s. Se tiene especial cuidado en no dañar el aporte vascular al ojo.

Administración local de anticuerpos y solución de tampón

Después de lesión de contusión del nervio óptico se trataron ratas Sprague Dawley macho localmente con anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo de control 8D1 (n = 10 animales) o con un PBS de control de vehículo (n = 10 animales). Los experimentadores eran ciegos para los diferentes grupos de tratamiento. Para aplicación de anticuerpo local, se empaparon trozos de gelfoam pequeños (longitud: 2,5 mm, anchura: 2,5 mm, altura: 2,5 mm) con 20 µl de una solución de anticuerpo 10 mg/ml o con 20 µl de PBS y se colocaron directamente adyacentes al sitio de lesión del nervio óptico. Después de cirugía invasiva mínima y aplicación de anticuerpos, los animales se colocaron en toallas de papel en la jaula limpia montada sobre el calentador para controlar la temperatura corporal hasta que comenzaron a moverse. Se aplicó una pomada que contiene antibiótico (Gentamytex, Dr. Mann Pharma) al ojo para evitar la infección bacteriana y el secado de la esclerótica. Se aplicó Carprofeno (Rimadyl, 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) i.p. para terapia de dolor post-operatorio directamente después de la cirugía y después dos veces al día durante un periodo de 3 días. Los animales se observaron y se controlaron regularmente varias horas directamente después de la cirugía y al día siguiente para asegurarse de que todos los animales sobrevivieron y se recuperaron de la anestesia y la cirugía. 5 semanas después de la cirugía y la aplicación de anticuerpo/vehículo, los animales se anestesiaron con una sobredosis de Narcoren (40 – 60 mg/kg) y se perfundieron por inyección de solución de paraformaldehído al 4% al corazón. Se aislaron nervios ópticos y se transfirieron a una solución de paraformaldehído al 4% durante 1 h a temperatura ambiente para asegurar la fijación apropiada al tejido. Después de la postfijación, los nervios ópticos de rata se almacenaron durante una noche en una solución de sacarosa al 30% (4 °C). Al día siguiente los nervios ópticos se incluyeron en Tissue Tek, se congelaron y se realizaron las secciones longitudinales con un grosor de 16 µm usando un Criostato.

Para inmunotinciones, se fijaron secciones del nervio óptico con Acetona fría (-20 °C) (10 min), se lavaron 3x (5 min) con Solución Salina Tamponada con Tris (TBS, Fluka 93312) y se bloquearon y permeabilizaron con TBS, que contenía Albúmina de Suero Bovino 5% y Triton-X-100 1% (30 min) a temperatura ambiente. Se retiró la BSA y el detergente residuales por 2 etapas de lavado separadas (5 min cada una) con TBS. Las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GAP-43 (Abcam, ab 7562), diluido 1:100 en solución de BSA/TBS 5%. Después de 3 etapas de lavado con TBS, Tween 0,1%, se incubaron secciones durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034) diluido 1:1000 en BSA/TBS 5%, que contenía una dilución 1:100 de Bisbenzimidida

(H33258, 50 µg/ml) para visualizar núcleos celulares. Antes de la inclusión, las secciones teñidas se lavaron 3 veces con TBS, Tween 0,1% (5 min cada etapa) y con agua destilada. Las secciones se incluyeron en Fluoromount G, se recuperaron por un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para documentación microscópica.

5 Usando un microscopio de fluorescencia de Zeiss se almacenaron imágenes (Figura 11) de secciones longitudinales teñidas usando el software Zeiss Axiovision. Se montaron imágenes individuales de cada nervio para análisis usando software de Análisis de Imágenes PhotoShop (Adobe). Se realizó análisis cuantitativo de dos maneras diferentes usando las imágenes compuestas de los nervios ópticos. El área GAP-43 positiva en el sitio de lesión se midió usando el software Axiovision (Figuras 12B). Independientemente del primer análisis cuantitativo se contaron
10 fibras regenerativas individuales (GAP-43 positivas) en 4 áreas diferentes: 0 – 200 µm, 200 - 400 µm, 400 - 600 µm y 600 - 1200 µm más allá del sitio de contusión. El análisis de datos y la evaluación estadística de los datos se realizó con la ayuda del software Graphpad Prism. (Figura 12A).

Administración sistémica de anticuerpos y solución de tampón

15 Para el suministro de anticuerpos sistémico, se trataron ratas Wistar macho de forma sistémica (por vía intraperitoneal, ip, o por vía intravenosa, iv) con anticuerpo 5F9 o con un PBS de control de vehículo (n = 10 animales). Los animales se inyectaron dos veces y se realizaron inyecciones el día 0 poco después de inducir la contusión nerviosa y el día 21 después de la contusión. Las dosis de anticuerpo proporcionadas fueron de 2 mg/kg
20 el día 0 y 10 mg/kg el día 21. Los animales se sacrificaron cinco semanas después de la lesión por contusión y se realizó aislamiento tisular, preparación de secciones, tinciones y análisis cuantitativo como se ha descrito anteriormente. Como antes los experimentadores estaban ciegos para los dos grupos de tratamiento diferentes. Se muestran imágenes compuestas de nervios ópticos de rata en la Figura 13. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras GAP-43 positivas se extienden más allá del sitio de contusión en contraste con los animales de control tratados con PBS (B). El sitio de contusión se localiza en el margen izquierdo y se tiñen fibras regenerativas con un anticuerpo para GAP-43. Se observan muchas fibras en el borde superior e inferior del nervio óptico en
25 animales tratados con 5F9 pero no en animales con PBS.

30 5F9 pero no el PBS de control de vehículo aumentó significativamente el número de fibras GAP-43 positivas regenerativas. Se descubrieron significativamente más fibras ($p < 0,001$) en animales tratados con 5F9 a distancias de 300 µm a 1800 µm, que en animales tratados con vehículo. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y d21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se proporcionó anticuerpo o vehículo por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Los datos son de análisis de 9 animales por grupo. Por cada animal se analizaron 3 series de secciones de criostato. (Figura 14A).

35 En un segundo experimento, las ratas Wistar macho se trataron después de lesión de nervio óptico de forma sistémica (iv) con anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo de control 8D1 (n = 10 animales) o con el PBS de control de vehículos (n = 10 animales). Se inyectó a las ratas una vez por semana 2 mg/kg de anticuerpo proporcionado iv y las inyecciones se iniciaron inmediatamente después de la contusión del nervio óptico. Todas las
40 ratas recibieron 4 inyecciones y los animales se sacrificaron 5 semanas después de la lesión por contusión. Los experimentadores estaban ciegos y se realizó procesamiento tisular y análisis cuantitativo como se ha descrito anteriormente. 5F9 pero no el PBS de control de vehículo aumentó significativamente el número de fibras GAP-43 positivas regenerativas. Se descubrieron significativamente más fibras ($p < 0,001$) en animales tratados con 5F9 a distancias de 200 µm a 1400 µm, que en animales tratados con anticuerpo de control o vehículo. Los animales se
45 trataron iv una vez por semana durante 4 semanas comenzando el día 0 con 5F9 (2 mg/kg por dosis), con el anticuerpo de control 8D1 (2 mg/kg por dosis) o con PBS. (Figura 14B).

Ejemplo 12: 5F9 induce remielinización de axones de nervios ópticos dañados, contusionados, en un modelo de rata de lesión del nervio óptico.

50 Un marcador para oligodendrocitos y mielina es la proteína básica de mielina (MBP). Se usó un anticuerpo dirigido contra MPB para responder a la pregunta de si se producen diferencias en la remielinización en los diferentes grupos de tratamiento. Para visualizar el proceso de remielinización, las secciones de nervio óptico de animales tratados sistémicamente se fijaron con Acetona fría (-20 °C) (10 min), se lavaron 3x (5 min) con Solución Salina
55 Tamponada con Tris (TBS, Fluka 93312) y se bloquearon y permeabilizaron con TBS, que contenía Albúmina de Suero Bovino 5% y Triton-X-100 1% (30 min) a temperatura ambiente. Se retiró la BSA y detergentes residuales por 2 etapas de lavado separadas (5 min cada una) con TBS. Se incubaron secciones durante 3 h o durante una noche a 4 °C con un anticuerpo anti-MBP de conejo policlonal (Abcam, ab 2404) diluido 1:50 en solución de BSA/TBS 5%. Después de 3 etapas de lavado con TBS, Tween 0,1%, se incubaron secciones durante 1 h a temperatura ambiente
60 con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034) diluido 1:1000 en BSA/TBS al 5%, que contenía una dilución 1:100 de Bisbenzimidida (H33258, 50 pg/ml) para visualizar núcleos celulares. Antes de la inclusión, las secciones teñidas se lavaron 3 veces con TBS, Tween 0,1% (5 min cada etapa) y con agua destilada. Las secciones se incluyeron en Fluoromount G, se cubrieron por un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para documentación microscópica.

65

5 Usando un microscopio de fluorescencia Zeiss se almacenaron imágenes de secciones longitudinales teñidas usando el software Zeiss Axiovision. Se montaron imágenes individuales de cada nervio para su análisis usando software de Análisis de Imágenes PhotoShop (Adobe). Se realizó el análisis cuantitativo de dos maneras diferentes usando las imágenes compuestas de los nervios ópticos. El área MBP positiva en el sitio de lesión se midió usando el software Axiovision. Se realizó análisis de datos y evaluación estadística de los datos con la ayuda del software Graphpad Prism.

10 Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y d21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se proporcionó anticuerpo o vehículo por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata.

15 La mielinización se visualizó usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina proteína básica de mielina MBP. Los sitios de contusión se localizan en el medio de los nervios compuestos y el área está libre en animales de control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras MBP positivas en el área media (centro contusionado) de los nervios ópticos. (Figura 15).

20 La mielinización se visualizó usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina proteína básica de mielina MBP. El área de MBP se midió usando el software Zeiss Axiovision. M1 y M2 son dos mediciones independientes y M es el promedio del para MPB positiva medida. 5F9 aumenta significativamente ($p < 0,001$ frente al control de vehículo) el área de MBP del sitio de contusión de nervio óptico por un factor de 3,5 (Figura 16).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Abbott GmbH & Co. KG
- 25 <120> Anticuerpos contra la proteína RGM A y usos de los mismos
- <130> M/49229-PCT
- <160> 68
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1353
- 35 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 40 <222> (1)..(1353)
- <400> 1

ES 2 549 959 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 ett 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 | |

ES 2 549 959 T3

| | |
|---|------|
| 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 | |

ES 2 549 959 T3

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
 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

ES 2 549 959 T3

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

5 <210> 3
 <211> 1929
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> hRGMA fc

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1929)

15 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(102)

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (103)..(1230)
 <223> Fragmento de hRGMA 47-422

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1231)..(1929)
 <223> parte fc

30 <400> 3

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
 Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
 Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
 Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 65 70 75 80

tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288
 Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

ES 2 549 959 T3

| | |
|---|------|
| ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca | 336 |
| Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro | |
| 100 105 110 | |
| cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac | 384 |
| Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp | |
| 115 120 125 | |
| agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc | 432 |
| Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala | |
| 130 135 140 | |
| acc ccc aac tac acg cac tgt gcc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg | 480 |
| Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg | |
| 145 150 155 160 | |
| act ttc acc gac cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg | 528 |
| Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro | |
| 165 170 175 | |
| ctc atc gac aat aat tac ctg aac gtg cag gtc acc aac acg cct gtg | 576 |
| Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val | |
| 180 185 190 | |
| ctg ccc ggc tca gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc | 624 |
| Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe | |
| 195 200 205 | |
| aag aac ttc cag gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg | 672 |
| Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met | |
| 210 215 220 | |
| gac gag ctc ccg gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac | 720 |
| Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp | |
| 225 230 235 240 | |
| aag cac ggg gcc aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag | 768 |
| Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln | |
| 245 250 255 | |
| cac gtg gag atc cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc | 816 |
| His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg | |
| 260 265 270 | |
| cag gtg ggc cgc tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg | 864 |
| Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val | |
| 275 280 285 | |
| gtc aat gct gtg gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg | 912 |
| Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu | |
| 290 295 300 | |
| cgg ggc tgc ccc ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc | 960 |
| Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr | |
| 305 310 315 320 | |
| aat gct gag ggc acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca | 1008 |
| Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala | |
| 325 330 335 | |
| ccc aca gcc ccc gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc | 1056 |
| Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys | |
| 340 345 350 | |

ES 2 549 959 T3

| | |
|---|------|
| aag gag aag ctg ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe 355 360 365 | 1104 |
| gac ctc ctc acc acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr 370 375 380 | 1152 |
| gcg ttg gag gat gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His 385 390 395 400 | 1200 |
| ctg tat gag agg act cgg gac ctg cca ggc ttg aat tct gca gat atc Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile 405 410 415 | 1248 |
| gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 420 425 430 | 1296 |
| ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 435 440 445 | 1344 |
| tcc egg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 450 455 460 | 1392 |
| gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 465 470 475 480 | 1440 |
| aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 485 490 495 | 1488 |
| gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 500 505 510 | 1536 |
| gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 515 520 525 | 1584 |
| aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 530 535 540 | 1632 |
| acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 545 550 555 560 | 1680 |
| acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 565 570 575 | 1728 |
| gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 580 585 590 | 1776 |
| ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp | 1824 |

ES 2 549 959 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|------|
| | 595 | | 600 | | 605 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | atg | cat | | | | 1872 |
| | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | | | | |
| | 610 | | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | | | |
| | gag | gct | ctg | cac | aac | cac | tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | ctg | tct | ccg | | | | 1920 |
| | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | | | | |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | |
| | ggt | aaa | tga | | | | | | | | | | | | | | | | | 1929 |
| | Gly | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 4
 <211> 642
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
| Met | Glu | Thr | Asp | Thr | Leu | Leu | Leu | Trp | Val | Leu | Leu | Leu | Trp | Val | Pro | | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | | | | | |
| Gly | Ser | Thr | Gly | Asp | Ala | Ala | Gln | Pro | Ala | Arg | Arg | Ala | Arg | Arg | Thr | | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | | 30 | | | | | |
| Lys | Leu | Pro | Cys | Lys | Ile | Leu | Lys | Cys | Asn | Ser | Glu | Phe | Trp | Ser | Ala | | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | | |
| Thr | Ser | Gly | Ser | His | Ala | Pro | Ala | Ser | Asp | Asp | Thr | Pro | Glu | Phe | Cys | | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | |
| Ala | Ala | Leu | Arg | Ser | Tyr | Ala | Leu | Cys | Thr | Arg | Arg | Thr | Ala | Arg | Thr | | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | | |
| Cys | Arg | Gly | Asp | Leu | Ala | Tyr | His | Ser | Ala | Val | His | Gly | Ile | Glu | Asp | | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | | |
| Leu | Met | Ser | Gln | His | Asn | Cys | Ser | Lys | Asp | Gly | Pro | Thr | Ser | Gln | Pro | | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | | |
| Arg | Leu | Arg | Thr | Leu | Pro | Pro | Ala | Gly | Asp | Ser | Gln | Glu | Arg | Ser | Asp | | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | | |
| Ser | Pro | Glu | Ile | Cys | His | Tyr | Glu | Lys | Ser | Phe | His | Lys | His | Ser | Ala | | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | | |
| Thr | Pro | Asn | Tyr | Thr | His | Cys | Gly | Leu | Phe | Gly | Asp | Pro | His | Leu | Arg | | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | |

ES 2 549 959 T3

Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro
 165 170 175
 Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val
 180 185 190
 Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe
 195 200 205
 Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met
 210 215 220
 Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp
 225 230 235 240
 Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln
 245 250 255
 His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg
 260 265 270
 Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val
 275 280 285
 Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu
 290 295 300
 Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr
 305 310 315 320
 Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala
 325 330 335
 Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys
 340 345 350
 Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe
 355 360 365
 Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr
 370 375 380
 Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His
 385 390 395 400
 Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile

ES 2 549 959 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | | | | | 415 |
| Glu | Gly | Arg | Met | Asp | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | | | | | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | | | |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | | | | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | | | |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | | | | | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | | | | |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | | | | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | | | | |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | | | | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 | | | | | |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | | | | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | | | |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | | | | | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | | | | |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | | | | | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | | | | | |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | | | | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | | | | |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | | | | | |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | | | | | |
| Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | | | | | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | | | | |
| Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | | | | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | | | | |
| Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | | | | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | | | | |
| Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | | | | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | | |
| Gly | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 5
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> hRGMA LC fc
 <220>
 10 <221> CDS
 <222> (1)..(1167)
 <220>
 15 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(102)
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (103)..(968)
 <223> Fragmento de hRGMA 47-168
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (469)..(1167)
 <223> parte fc
 <400> 5

 atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

 ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

 aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
 Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

 acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
 Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

 gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
 Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 65 70 75 80

 tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288
 Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

 ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca 336
 Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
 100 105 110

 cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac 384
 Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
 115 120 125

 agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc 432
 Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
 130 135 140

ES 2 549 959 T3

| | |
|---|------|
| acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac ttg aat tct gca | 480 |
| Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala | |
| 145 150 155 160 | |
| gat atc gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg | 528 |
| Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu | |
| 165 170 175 | |
| ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc | 576 |
| Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu | |
| 180 185 190 | |
| atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc | 624 |
| Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser | |
| 195 200 205 | |
| cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag | 672 |
| His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu | |
| 210 215 220 | |
| gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg | 720 |
| Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr | |
| 225 230 235 240 | |
| tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat | 768 |
| Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn | |
| 245 250 255 | |
| ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc | 816 |
| Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro | |
| 260 265 270 | |
| atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag | 864 |
| Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln | |
| 275 280 285 | |
| gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc | 912 |
| Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val | |
| 290 295 300 | |
| agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg | 960 |
| Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val | |
| 305 310 315 320 | |
| gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct | 1008 |
| Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro | |
| 325 330 335 | |
| ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc | 1056 |
| Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr | |
| 340 345 350 | |
| gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg | 1104 |
| Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val | |
| 355 360 365 | |
| atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg | 1152 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu | |
| 370 375 380 | |
| tct ccg ggt aaa tga | 1167 |
| Ser Pro Gly Lys | |
| 385 | |

ES 2 549 959 T3

<210> 6
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 65 70 75 80

Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
 100 105 110

Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
 115 120 125

Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
 130 135 140

Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala
 145 150 155 160

Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 195 200 205

ES 2 549 959 T3

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 7
<211> 1431
<212> ADN
<213> *Rattus sp.*

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1431)

10

<400> 7

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

48

ES 2 549 959 T3

| 1 | 5 | 10 | 15 | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg | | | | 96 |
| Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr | 20 | 25 | 30 | |
| aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt cca gtg tgg tgg aat tct | | | | 144 |
| Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser | 35 | 40 | 45 | |
| gca gat atc aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tcc ccg tgc aag atc | | | | 192 |
| Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile | 50 | 55 | 60 | |
| ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc acg tcg tca ggc agc cac | | | | 240 |
| Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His | 65 | 70 | 75 | 80 |
| gcc cct gcc tct gac gac gtg ccc gag ttc tgt gct gcc ctg cgc acc | | | | 288 |
| Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr | 85 | 90 | 95 | |
| tac gcc ctg tgc acg cga cgg aca gcc cgc acc tgc cgg ggc gac ctg | | | | 336 |
| Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu | 100 | 105 | 110 | |
| gct tac cac tgc gct gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag cac | | | | 384 |
| Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His | 115 | 120 | 125 | |
| aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tca cag cct cga gtg cgc acg ctc | | | | 432 |
| Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu | 130 | 135 | 140 | |
| ccg cca gct ggg gac agc cag gag cgc tca gat agc ccc gag atc tgc | | | | 480 |
| Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| cac tat gag aag agt ttc cac aag cac tca gct gcc ccc aac tac act | | | | 528 |
| His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr | 165 | 170 | 175 | |
| cac tgc ggc ctc ttt ggg gac cca cac ctc agg act ttc aca gac cac | | | | 576 |
| His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His | 180 | 185 | 190 | |
| ttc cag aca tgt aag gtg caa ggc gct tgg cct ctc atc gac aat aat | | | | 624 |
| Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn | 195 | 200 | 205 | |
| tac ctg aac gtg cag gtc acc aat aca cct gtg ctg ccc ggc tct gcc | | | | 672 |
| Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala | 210 | 215 | 220 | |
| gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc caa gag | | | | 720 |
| Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu | 225 | 230 | 235 | 240 |
| tgt gtg gac cag aaa gta tac caa gcc gag atg gac gag ctt ccg tcc | | | | 768 |
| Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser | 245 | 250 | 255 | |
| gcc ttt gcc gat ggc tcc aaa aac ggt gga gat aaa cac gga gcc aac | | | | 816 |

ES 2 549 959 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Ala | Phe | Ala | Asp | Gly | Ser | Lys | Asn | Gly | Gly | Asp | Lys | His | Gly | Ala | Asn | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| agc | ctg | aag | atc | aca | gag | aag | gtg | tca | ggc | cag | cac | gtg | gag | atc | cag | | 864 |
| Ser | Leu | Lys | Ile | Thr | Glu | Lys | Val | Ser | Gly | Gln | His | Val | Glu | Ile | Gln | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| gcc | aag | tac | atc | ggc | acc | acc | atc | gtg | gtg | aga | cag | gtg | ggc | cgc | tac | | 912 |
| Ala | Lys | Tyr | Ile | Gly | Thr | Thr | Ile | Val | Val | Arg | Gln | Val | Gly | Arg | Tyr | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | | |
| ctg | acc | ttc | gcc | gtc | cgg | atg | ccc | gag | gag | gta | gtc | aac | gcc | gtg | gag | | 960 |
| Leu | Thr | Phe | Ala | Val | Arg | Met | Pro | Glu | Glu | Val | Val | Asn | Ala | Val | Glu | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| gac | cgt | gac | agc | caa | ggc | ctc | tac | ctc | tgc | ctg | cgg | ggc | tgc | ccg | ctc | | 1008 |
| Asp | Arg | Asp | Ser | Gln | Gly | Leu | Tyr | Leu | Cys | Leu | Arg | Gly | Cys | Pro | Leu | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| aac | cag | cag | atc | gac | ttc | cag | gct | ttc | cgt | gcc | aac | gcc | gag | agc | cct | | 1056 |
| Asn | Gln | Gln | Ile | Asp | Phe | Gln | Ala | Phe | Arg | Ala | Asn | Ala | Glu | Ser | Pro | | |
| | | | 340 | | | | 345 | | | | | | 350 | | | | |
| cgc | agg | cca | gca | gct | gcc | agc | ccc | tct | cct | gtg | gtc | ccc | gag | aca | ttt | | 1104 |
| Arg | Arg | Pro | Ala | Ala | Ala | Ser | Pro | Ser | Pro | Val | Val | Pro | Glu | Thr | Phe | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| ccg | tac | gag | aca | gct | gtg | gcc | aag | tgc | aaa | gag | aag | ctg | cct | gta | gaa | | 1152 |
| Pro | Tyr | Glu | Thr | Ala | Val | Ala | Lys | Cys | Lys | Glu | Lys | Leu | Pro | Val | Glu | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| gac | ttg | tac | tac | cag | gcc | tgt | gtc | ttc | gac | ctc | ctc | acg | act | ggc | gac | | 1200 |
| Asp | Leu | Tyr | Tyr | Gln | Ala | Cys | Val | Phe | Asp | Leu | Leu | Thr | Thr | Gly | Asp | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | |
| gtg | aac | ttc | acg | ctg | gcc | gcc | tac | tat | gct | ttg | gag | gat | ggc | aag | atg | | 1248 |
| Val | Asn | Phe | Thr | Leu | Ala | Ala | Tyr | Tyr | Ala | Leu | Glu | Asp | Gly | Lys | Met | | |
| | | | | 405 | | | | 410 | | | | | | 415 | | | |
| ctc | cac | tcc | aac | aag | gac | aag | cta | cac | ctg | ttt | gaa | agg | act | cgg | gag | | 1296 |
| Leu | His | Ser | Asn | Lys | Asp | Lys | Leu | His | Leu | Phe | Glu | Arg | Thr | Arg | Glu | | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | |
| ctg | cct | gac | cca | gct | ttc | ttg | tac | aaa | gtg | gtg | ata | tcc | agc | aca | gtg | | 1344 |
| Leu | Pro | Asp | Pro | Ala | Phe | Leu | Tyr | Lys | Val | Val | Ile | Ser | Ser | Thr | Val | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | |
| gcg | gcc | gct | cga | gga | ggg | ccc | gaa | caa | aaa | ctc | atc | tca | gaa | gag | gat | | 1392 |
| Ala | Ala | Ala | Arg | Gly | Gly | Pro | Glu | Gln | Lys | Leu | Ile | Ser | Glu | Glu | Asp | | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |
| ctg | aat | agc | gcc | gtc | gac | cat | cat | cat | cat | cat | cat | tga | | | | | 1431 |
| Leu | Asn | Ser | Ala | Val | Asp | His | | | | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | | 475 | | | | | | |

<210> 8
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

5

<400> 8

ES 2 549 959 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser
35 40 45

Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile
50 55 60

Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His
65 70 75 80

Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr
85 90 95

Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu
100 105 110

Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His
115 120 125

Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu
130 135 140

Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys
145 150 155 160

His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr
165 170 175

His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His
180 185 190

Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn
195 200 205

Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala
210 215 220

Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu
225 230 235 240

Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser
245 250 255

ES 2 549 959 T3

Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn
 260 265 270

Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln
 275 280 285

Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr
 290 295 300

Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu
 305 310 315 320

Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu
 325 330 335

Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu Ser Pro
 340 345 350

Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu Thr Phe
 355 360 365

Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu
 370 375 380

Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp
 385 390 395 400

Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly Lys Met
 405 410 415

Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu
 420 425 430

Leu Pro Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser Thr Val
 435 440 445

Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 450 455 460

Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 465 470 475

<210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH 5F9

5

10

ES 2 549 959 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (62)..(62)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5

<400> 9

```

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

10

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> VL 5F9

<400> 10

```

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1           5           10
Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20           25           30
Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45
  
```

20

ES 2 549 959 T3

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Región constante Ig gamma-1

10

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

ES 2 549 959 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de región constante Ig gamma-1

10

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

ES 2 549 959 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |

ES 2 549 959 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Región constante Ig Kappa

10

<400> 13

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

15

<210> 14
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Región constante Ig Lambda

ES 2 549 959 T3

<400> 14

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

5 <210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VH3-48/JH3 FR1

<400> 15

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

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

15 <210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH3 FR2

25 <400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

30 <210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 549 959 T3

<220>

<223> VH3-48/JH3 FR3

<400> 17

5

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 18

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH3-49/JH3 FR4

15

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

20

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> VH3-48/JH4 FR4

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> VH3-48/JH6 FR4

40

<400> 20

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

45

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> VH3-33/JH6 FR!

<400> 21

ES 2 549 959 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

5 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH3-33/JH6 FR2
 <400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

15 <210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> VH3-33/JH6 FR3
 <400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

25 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR1
 <400> 24

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

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

40 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR2
 <400> 25

ES 2 549 959 T3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

5 <210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR3
 <400> 26

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

15 <210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> A18/JK2 FR1
 <400> 27

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

25 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

30 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> A18/JK2 FR2
 <400> 28

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 29
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> A18/JK2 FR3
 <400> 29

ES 2 549 959 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> A18/JK2 FR4
 <400> 30

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

15 <210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> A17/JK2 FR1
 <400> 31

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

25 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

30 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> A17/JK2 FR2
 <400> 32

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> A17/JK2 FR3
 <400> 33

ES 2 549 959 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 34
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VH 5F9

10

<400> 34

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

15

<210> 35
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> VH 5F9.1-GL

<400> 35

ES 2 549 959 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VH 5F9.2-GL

10

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ES 2 549 959 T3

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

5 <210> 37
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VH 5F9.3-GL
<400> 37

ES 2 549 959 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

5 <210> 38
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH 5F9.4-GL
 <400> 38

ES 2 549 959 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VH 5F9.5-GL

10

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ES 2 549 959 T3

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

5 <210> 40
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VH 5F9.6-GL
<400> 40

ES 2 549 959 T3

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

115

5 <210> 41
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> VH 5F9.7-GL
 <400> 41

ES 2 549 959 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VH 5F9.8-GL

10

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ES 2 549 959 T3

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> VH 5F9.9-GL

10

<400> 43

ES 2 549 959 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 45
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9.2-GL

<400> 45

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

5

10

ES 2 549 959 T3

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 46
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VL 5F9.3-GL

<400> 46

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

5

10

15

ES 2 549 959 T3

<210> 47
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VH h5F9.1

10

<400> 47

```

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

<210> 48
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> VH h5F9.2

20

<400> 48

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20           25           30
  
```

ES 2 549 959 T3

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

5 <210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VH h5F9.3

<400> 49

ES 2 549 959 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VL h5F9.19

<400> 51

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

5

10

ES 2 549 959 T3

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VL h5F9.20

10

<400> 52

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

15

ES 2 549 959 T3

<210> 53
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VL h5F9.21

10

<400> 53

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 54
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> VL h5F9.22

20

<400> 54

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

ES 2 549 959 T3

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 55
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH 8D1

<400> 55

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5

10

15

ES 2 549 959 T3

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> VL 8D1
 <400> 56
 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Arg Leu Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> VH 5F9 CDR H1
 20
 <400> 57
 Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H2
 30
 <400> 58

ES 2 549 959 T3

Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H3
 <400> 59

Gly Thr Thr Pro Asp Tyr
 1 5

15 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L1
 <400> 60

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu
 1 5 10 15

25 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L2
 <400> 61

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

40 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L3
 <400> 62

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr

50 1 5
 <210> 63
 <211> 5

ES 2 549 959 T3

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

5
<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> VL 8D1 CDR-L3
<400> 68

Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse con un epítipo de una molécula de RGM, comprendiendo dicho dominio de antígeno un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos tres regiones determinantes de complementariedad y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos tres regiones determinantes de complementariedad, donde las regiones determinantes de complementariedad del dominio variable de cadena pesada tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58 y SEC ID N°: 59 y donde las regiones determinantes de complementariedad del dominio variable de cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N: 60, SEC ID N: 61 y SEC ID N: 62.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende además un marco conservado aceptor humano, donde dicho marco conservado aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, donde el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 49 y 50.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 44, 45, 46, 51, 52, 53 y 54
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injertos de CDR, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble o un anticuerpo biespecífico.
6. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 8.
10. Un método para producir el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el método comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 9 en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El uso del anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurológica que se selecciona del grupo que consiste en Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, incluyendo Lesión Cerebral Traumática, Parálisis Cerebral, Guillain Barre, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Espinales, Ictus y Mielitis Transversa; demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, Enfermedad de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma y enfermedad de Alzheimer.
13. El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de Esclerosis Múltiple.

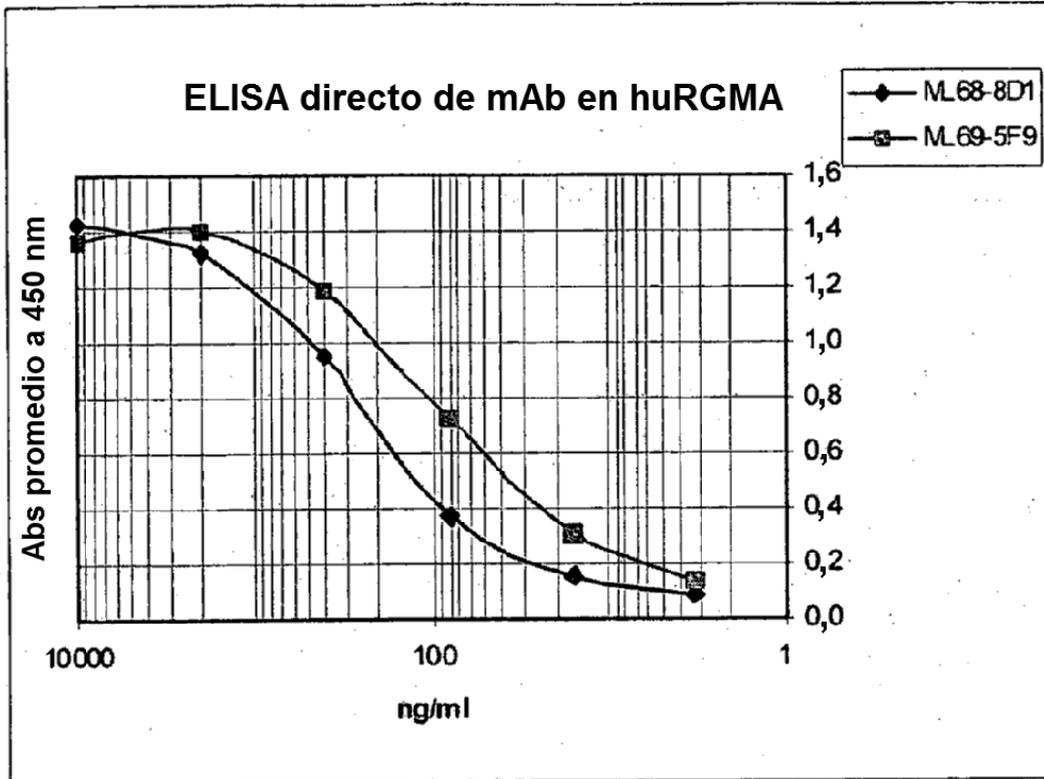


Fig. 1A

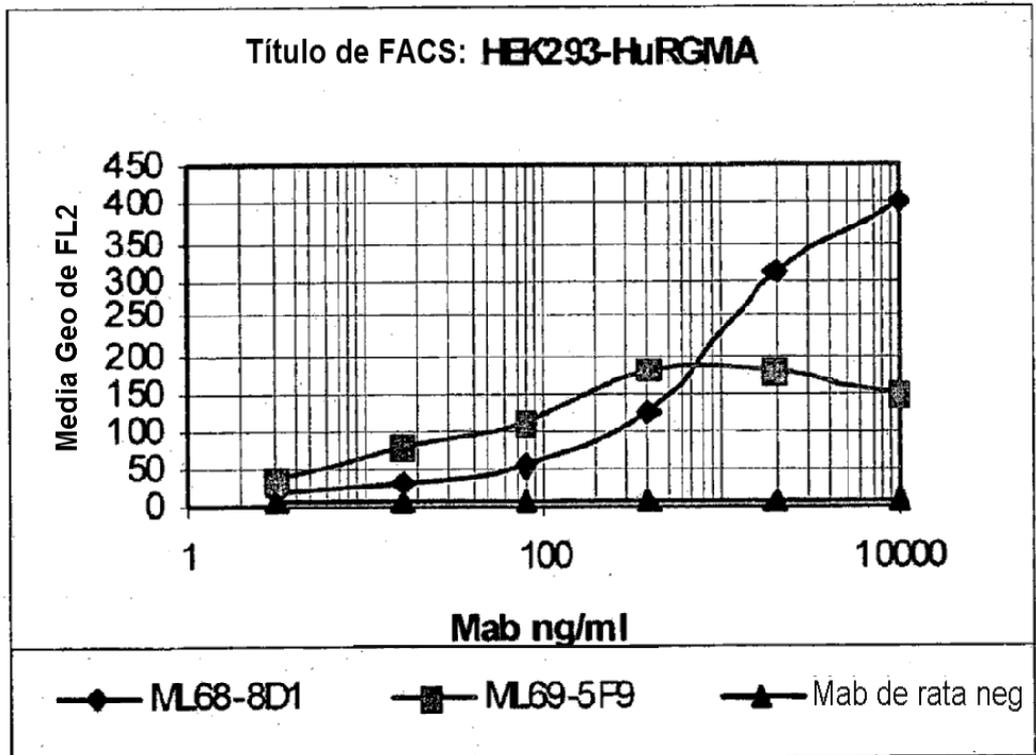


Fig. 1B

FACS de línea celular estable BAF3-ratRGMA

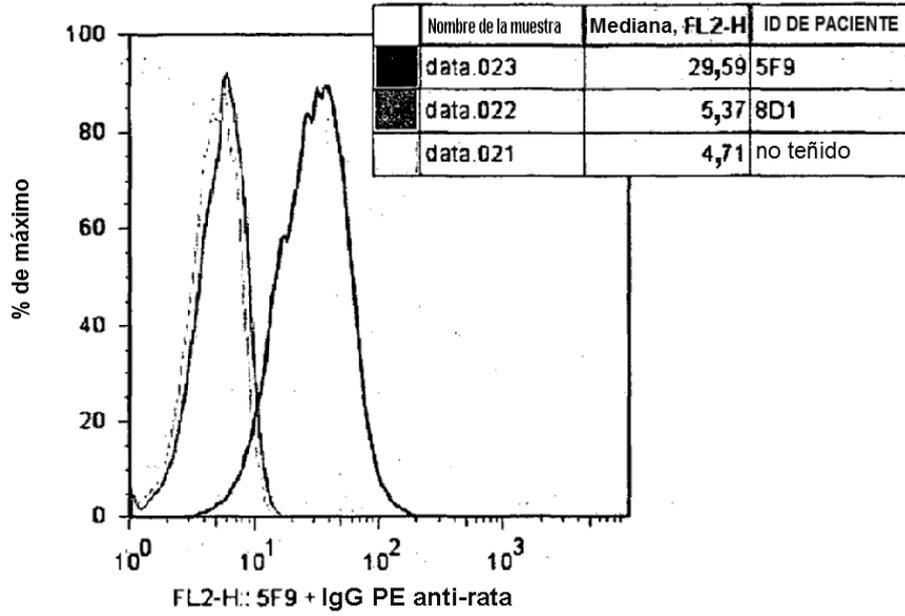


Fig. 1C

Inhibición de la unión de fl hRGM A con neogenina

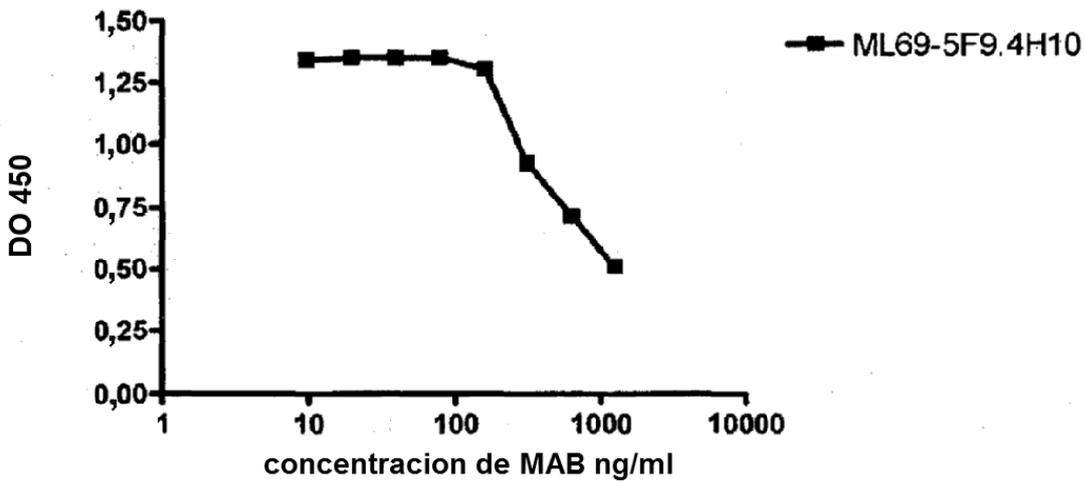


Fig. 2

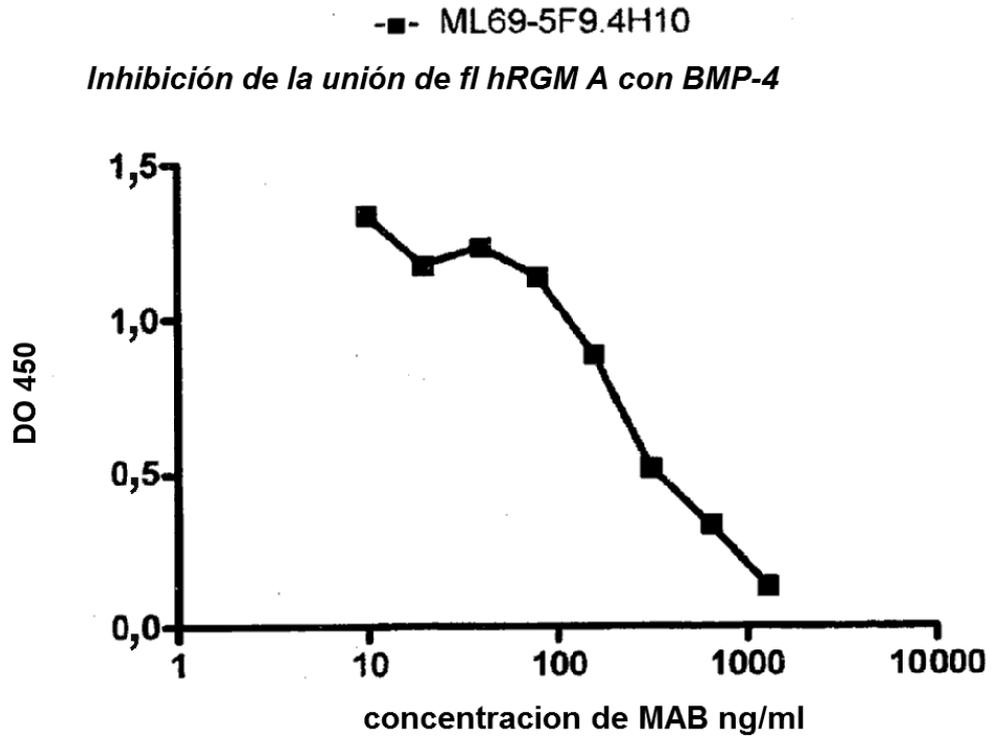


Fig. 3

Inhibición de la unión del fragmento 0 con BMP-4 por MAB 5F9

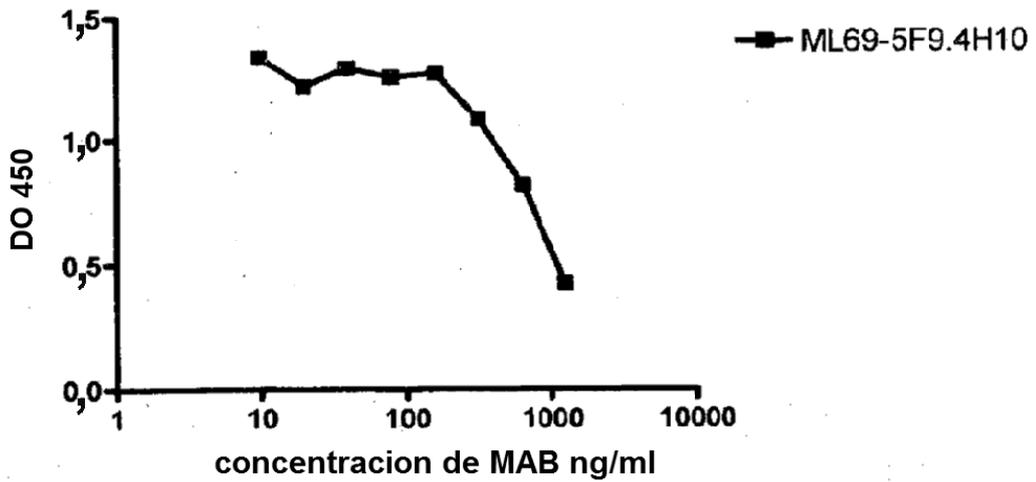


Fig. 4

Inhibición de la unión de hRGM A de longitud completa, conjugada con fc con BMP-2

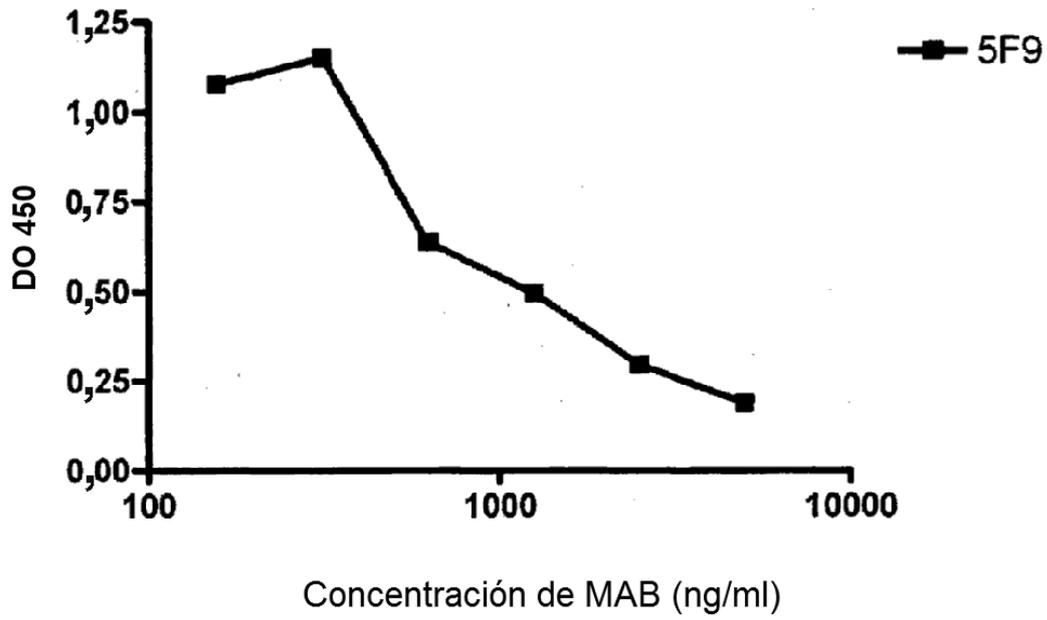


Fig. 5

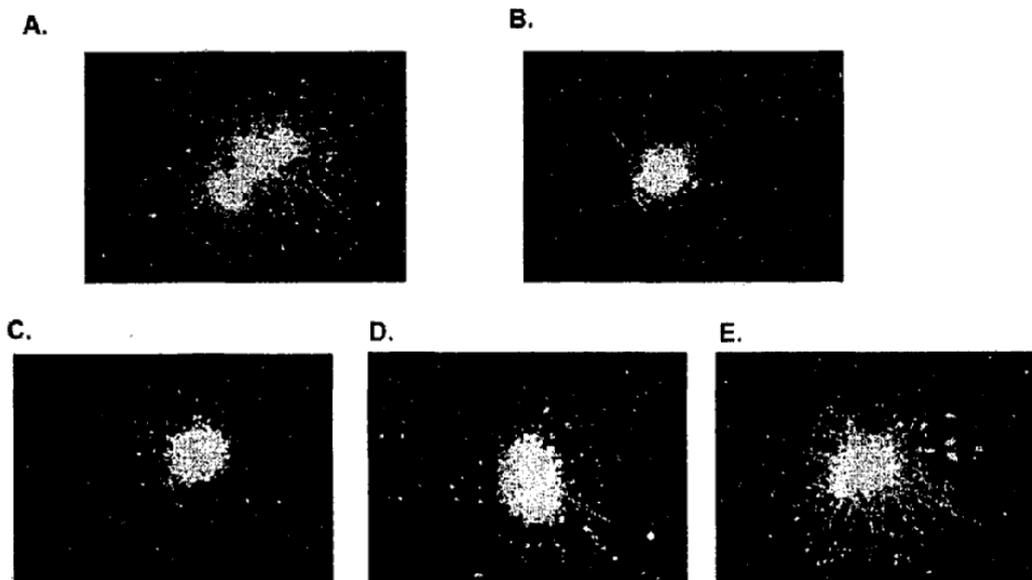


Fig. 6

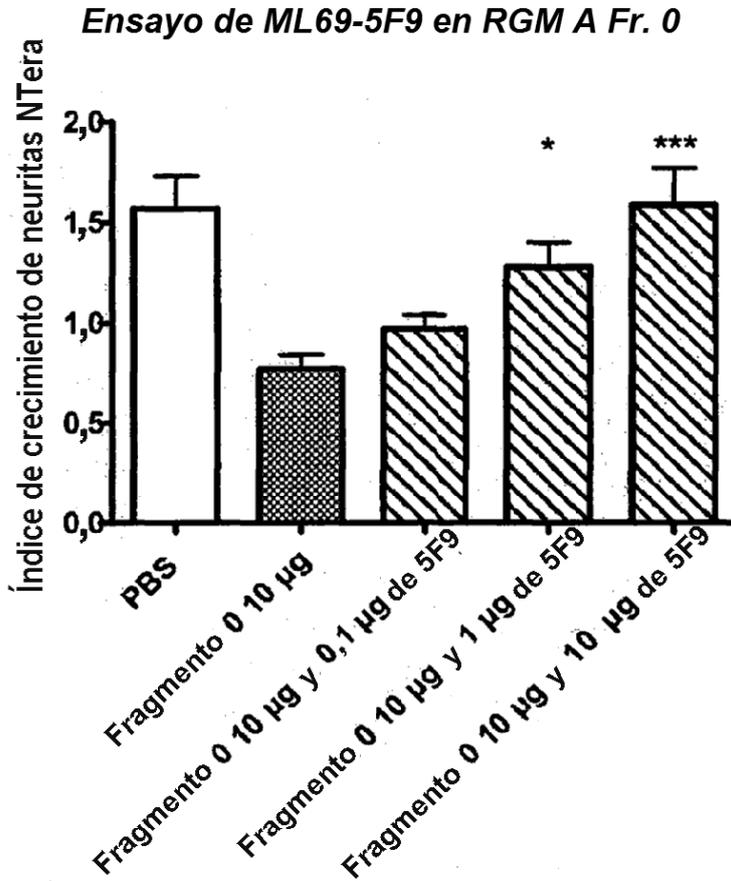


Fig. 7

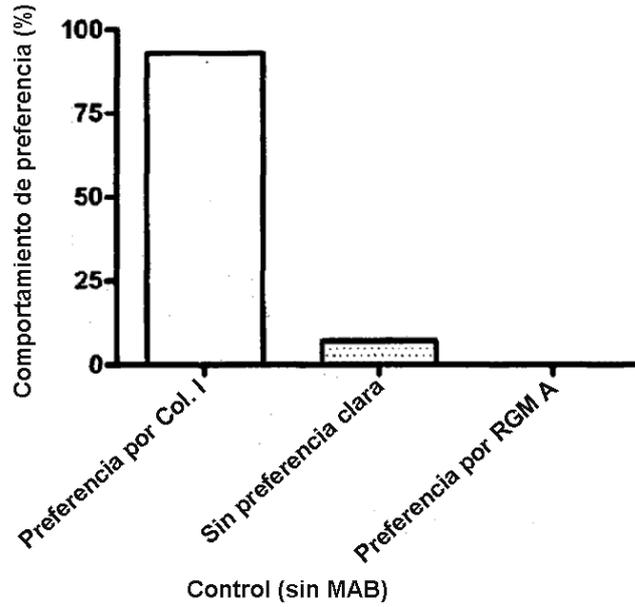


Fig. 8A

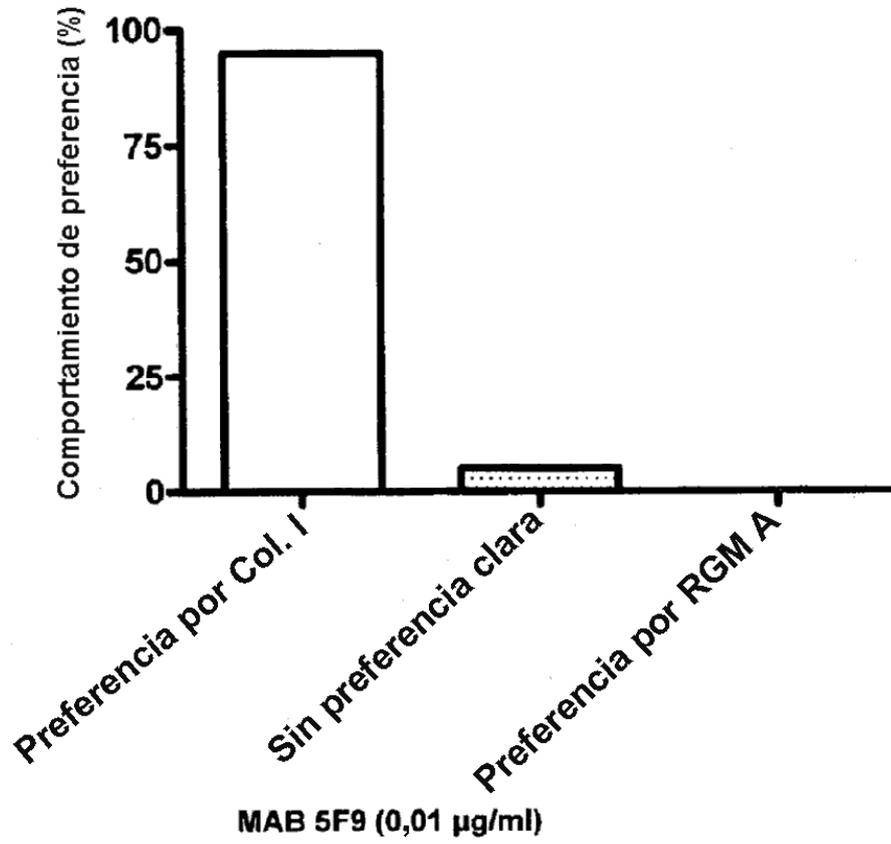


Fig. 8B

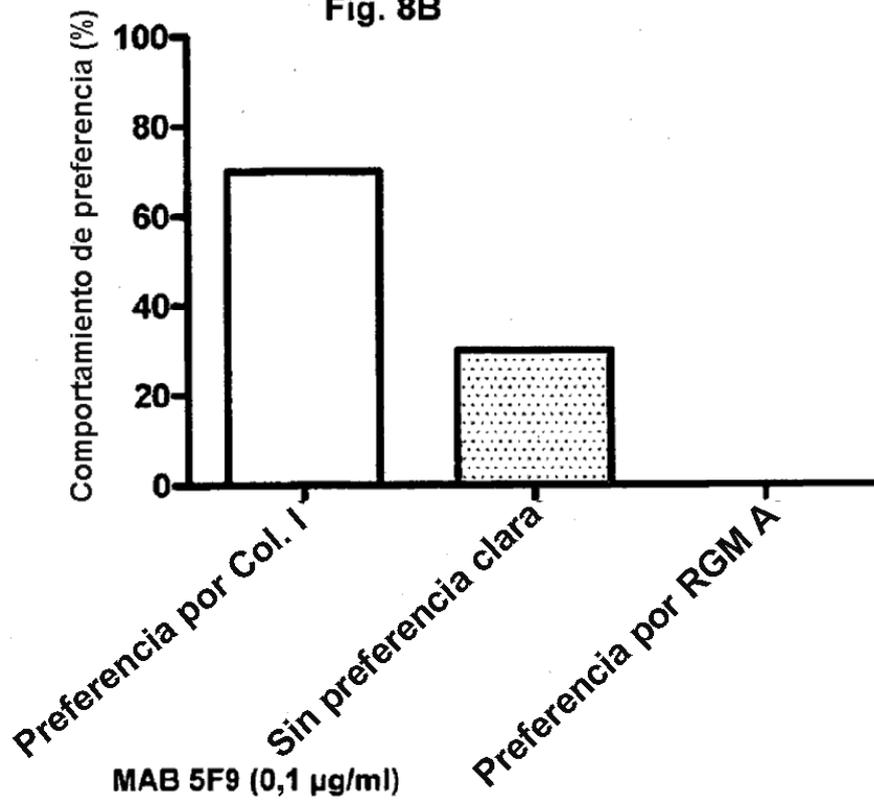


Fig. 8C

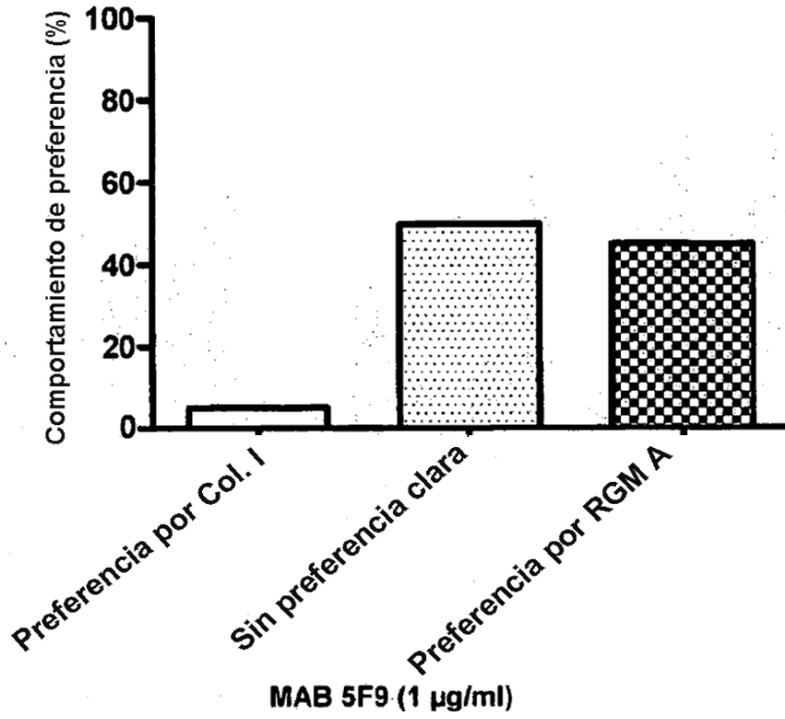


Fig. 8D

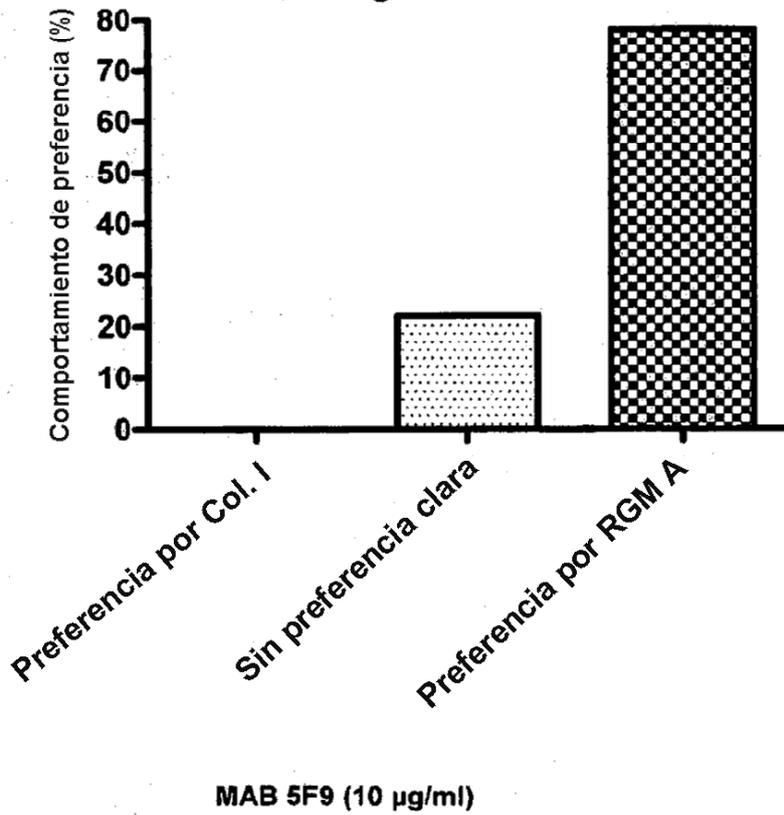


Fig. 8E

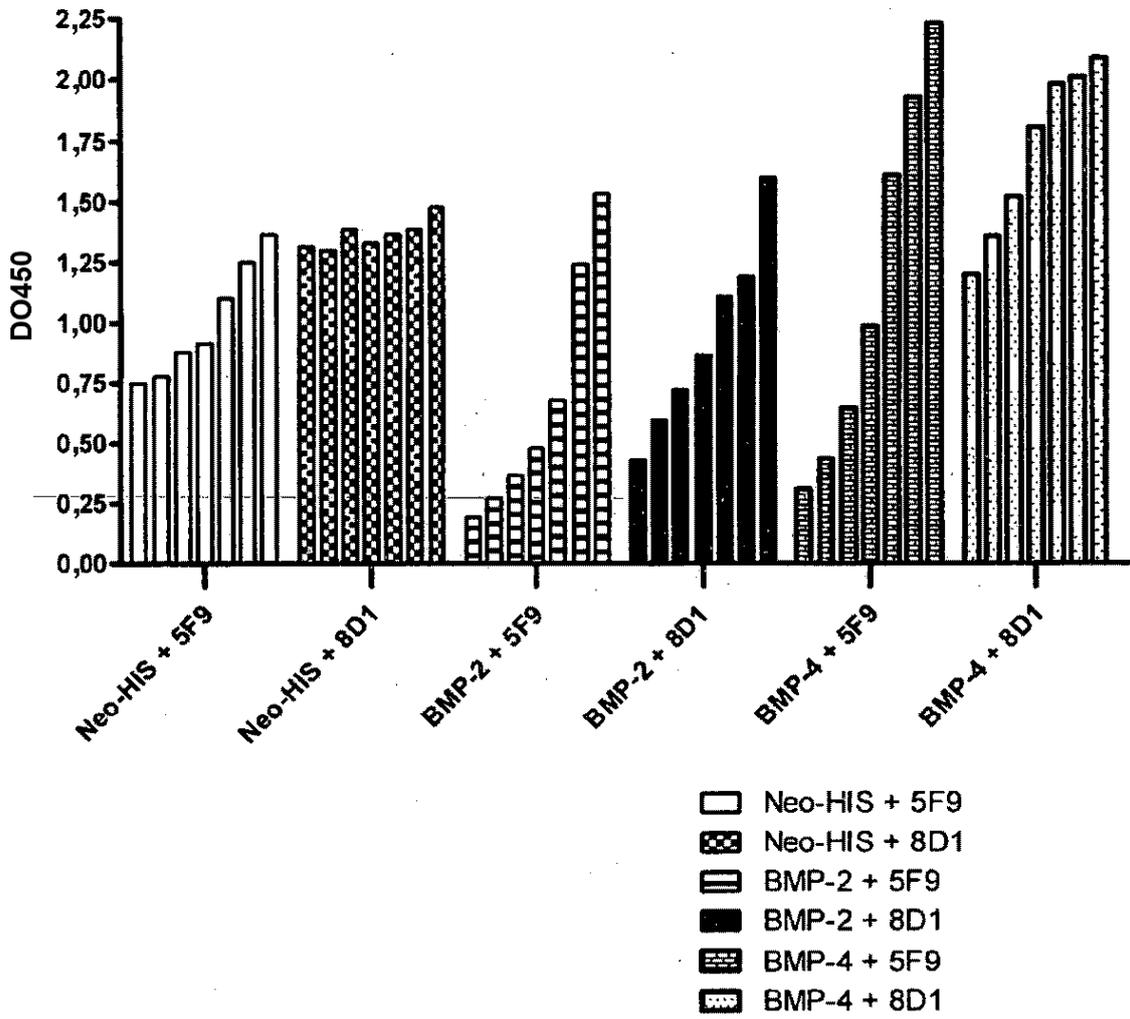
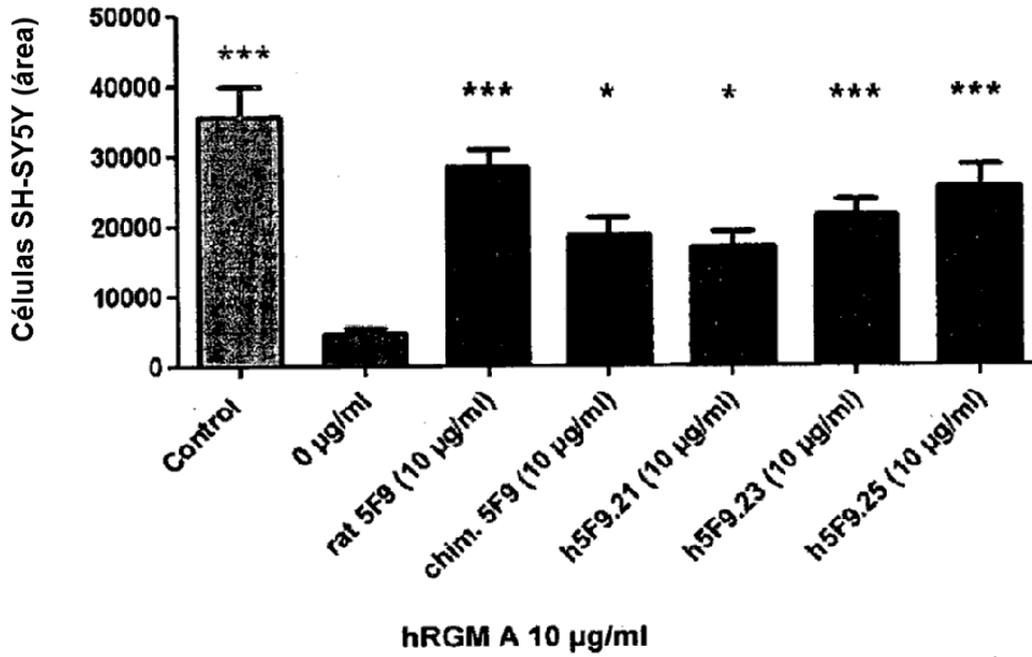


Fig. 9

Ensayo de quimiotaxis (sin EGF): ensayo de 5F9 de rata, quimérico, humanizado, n = 2



* p < 0,05: significación frente a 5F9 0 µg/ml
 *** p < 0,001: significación frente a 5F9 0 µg/ml
 *** p < 0,001: significación frente a 5F9 0 µg/ml

Fig. 10

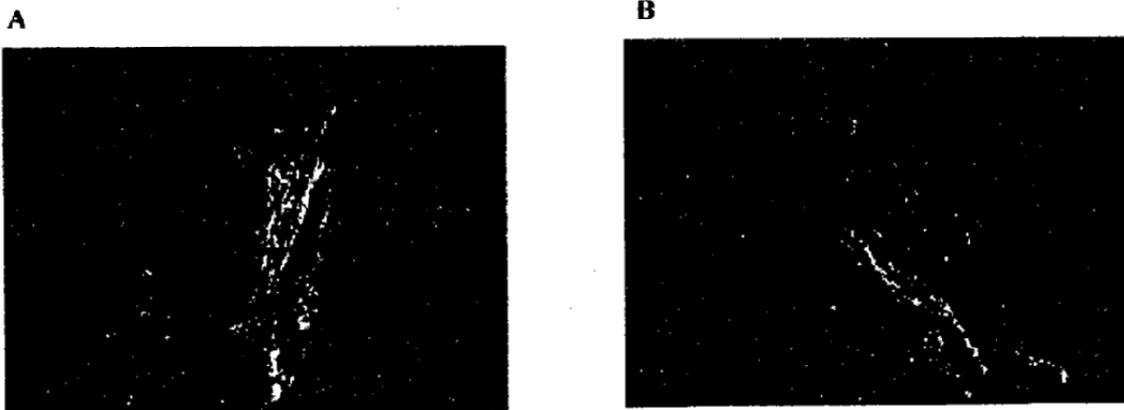


Fig. 11

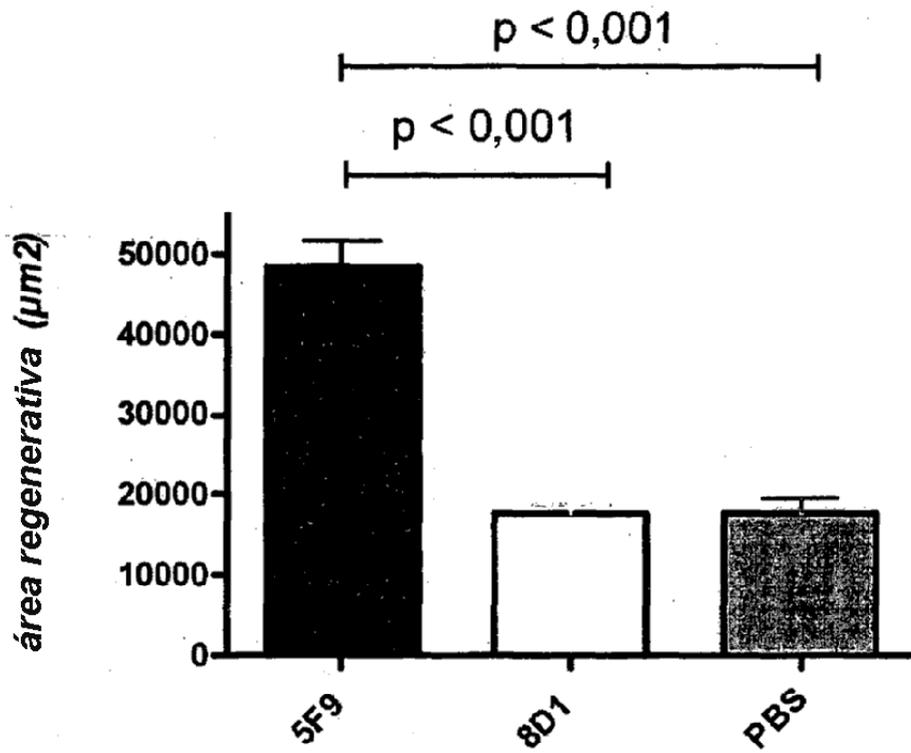
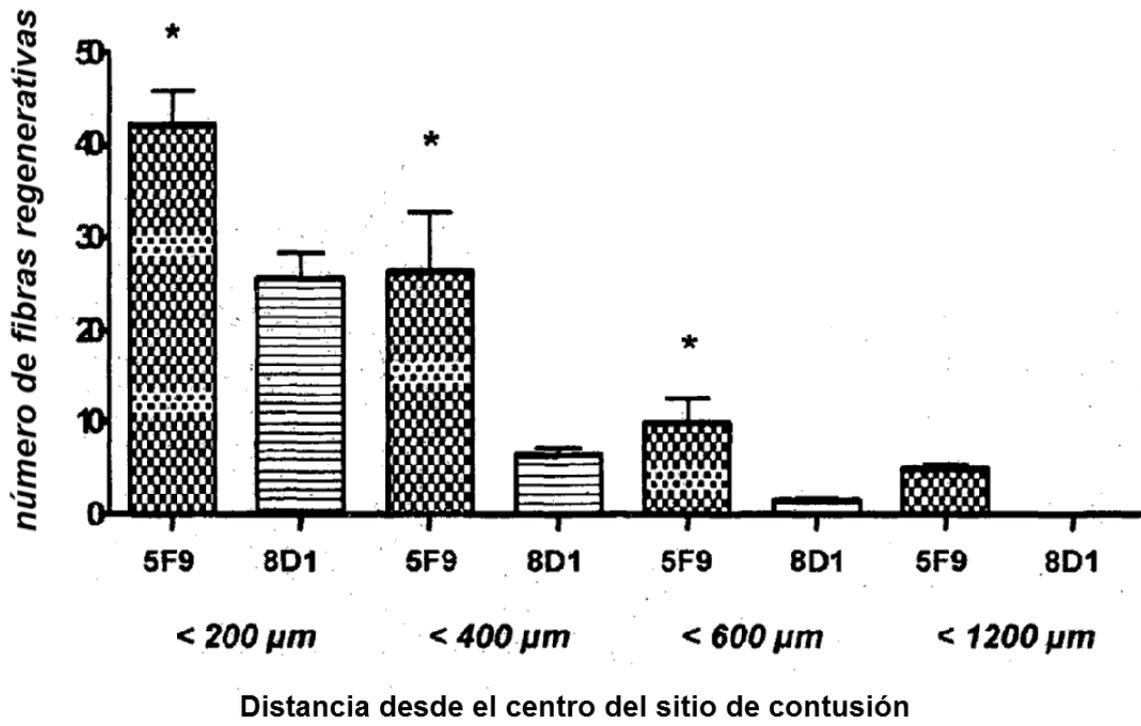


Fig. 12

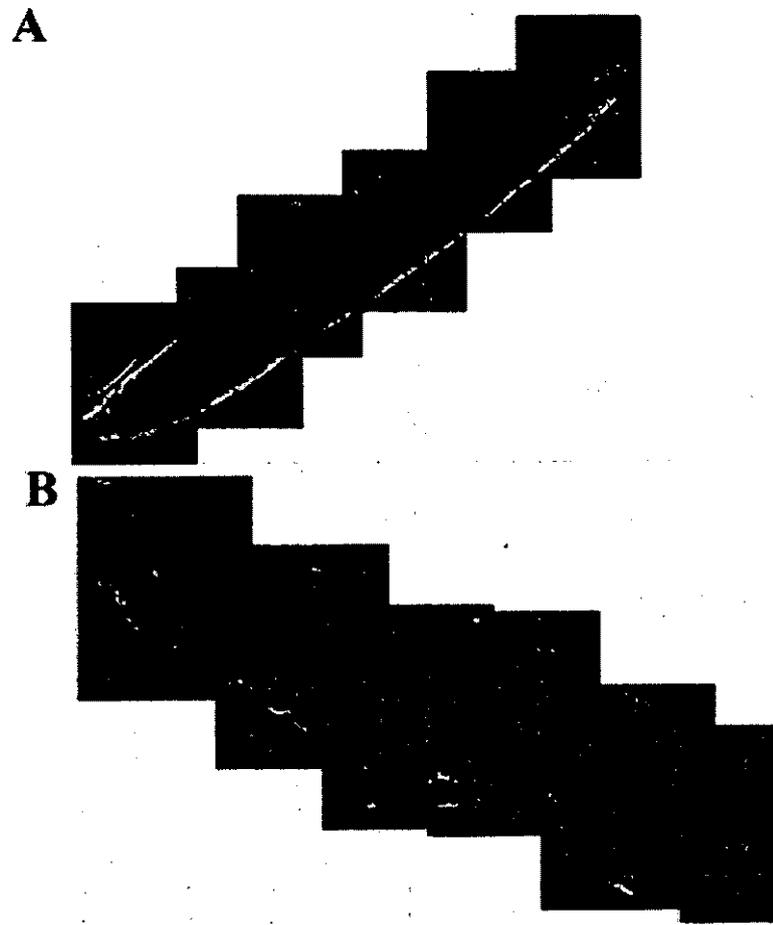


Fig. 13

Modelo de contusión de nervio óptico con tratamiento de 5F9 sistémico

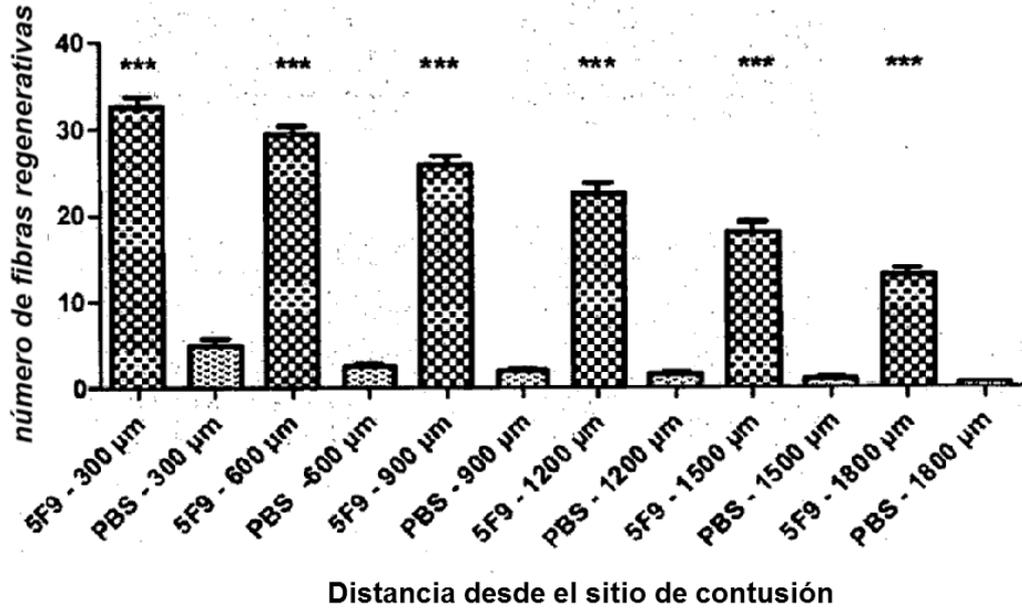


Fig. 14A

Contusión de nervio óptico
5F9 sistémico

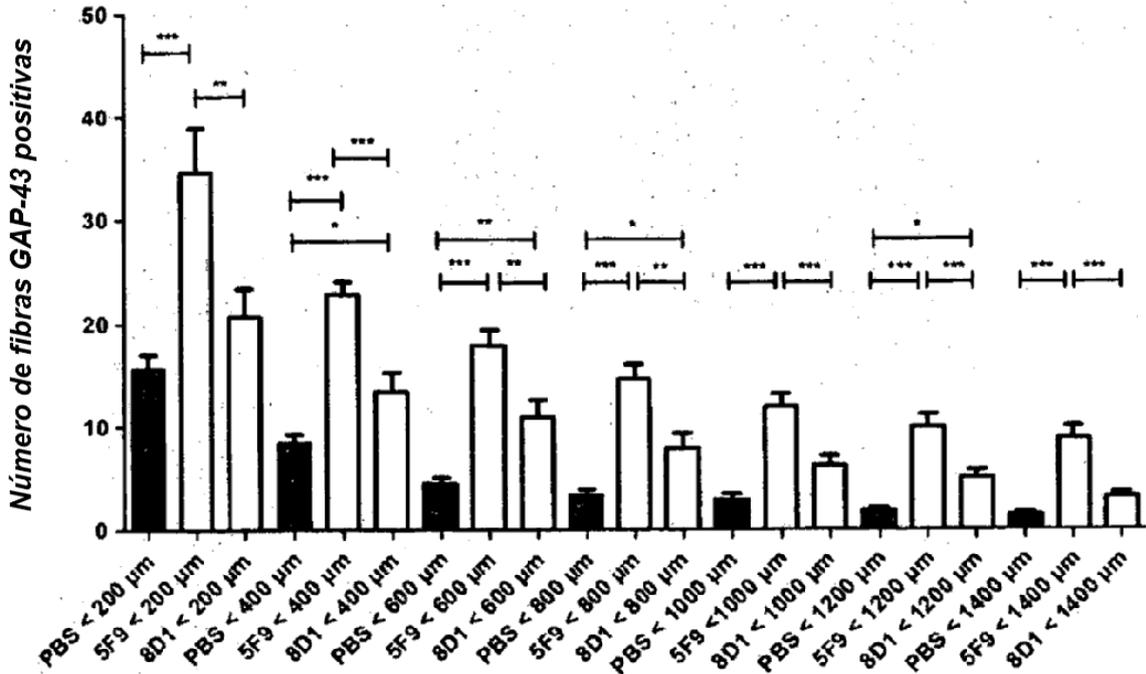


Fig. 14B

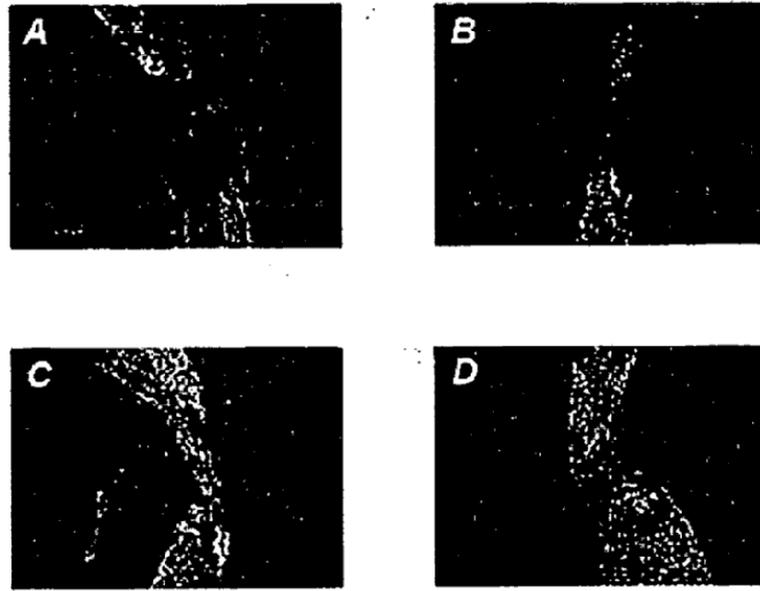


Fig. 15

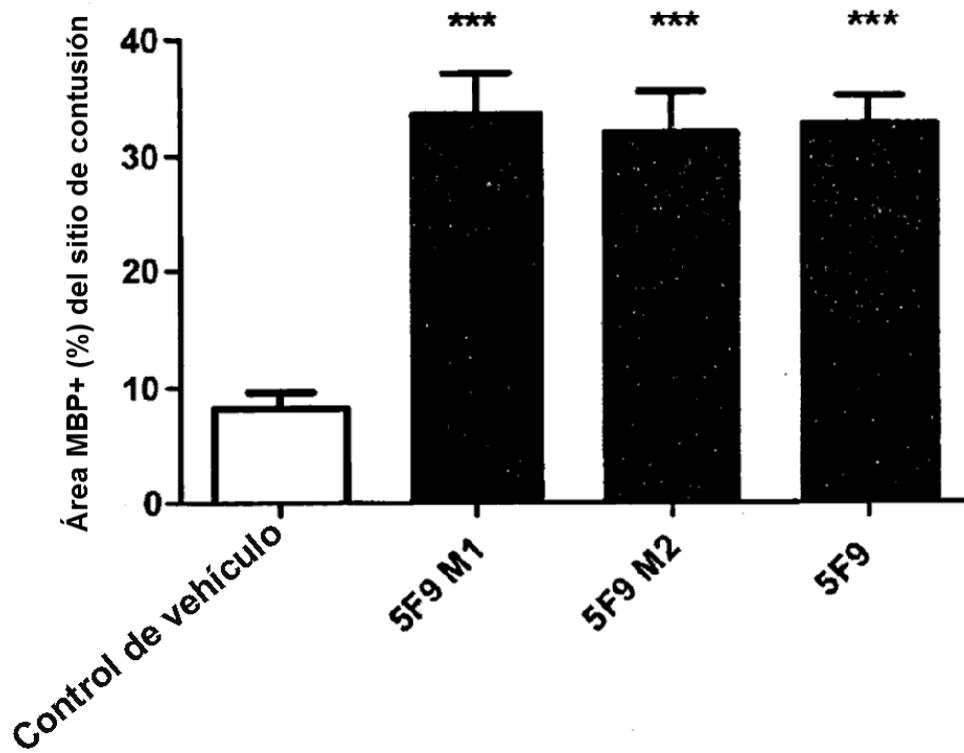


Fig. 16